

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE
PARA *Lox/2* EN LA FISIOLOGÍA Y EN LA PROGRESIÓN DE CARCINOMAS**

FERNANDO SALVADOR GÓMEZ

Madrid, 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE
PARA *Lox/2* EN LA FISIOLÓGÍA Y EN LA PROGRESIÓN DE CARCINOMAS**

Fernando Salvador Gómez

Licenciado en Bioquímica,

presenta esta memoria para optar al título de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de la Tesis:

Dra. Amparo Cano García, Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Alberto Martín Martín, Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica (Facultad de Medicina, UAM) y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), y financiada por una Beca JAE-PREDOC del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madrid, 2014



Dra. Amparo Cano García

Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Alberto Martín Martín

Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN QUE:

Fernando Salvador Gómez, Licenciado en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina – Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado “Caracterización de modelos animales modificados genéticamente para *Lox12* en la fisiología y en la progresión de carcinomas”.

El presente trabajo cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral

Madrid, 30 de abril de 2014

Fdo. **Dra. Amparo Cano García**

Fdo. **Dr. Alberto Martín Martín**

Resumen / Abstract

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, siendo la metástasis la responsable del 90% de las muertes por esta enfermedad. La metástasis conlleva una serie de etapas que implican invasión, diseminación y colonización de órganos distantes. En el contexto de la progresión de carcinomas, la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM), se considera esencial para la invasión y otras etapas de la metástasis. La pérdida de cadherina-E es un evento clave de la TEM, habiéndose descrito numerosos factores de transcripción represores de cadherina-E e inductores de TEM, como Snail1. Trabajos previos de nuestro grupo identificaron a la *lisil oxidasa-like 2* (LOXL2) como un regulador positivo de la estabilidad de Snail1 y como inductor de TEM, incluso de manera independiente de Snail1. LOXL2 pertenece a la familia de lisil oxidasas, formada por un conjunto de proteínas cuya función clásica es catalizar el entrecruzamiento de las fibras que componen la matriz extracelular (MEC), participando en procesos fisiológicos y patológicos, como la fibrosis o el cáncer. Sin embargo, en los últimos años, numerosos estudios, incluidos los de nuestro grupo, han demostrado la implicación de LOXL2 en procesos intracelulares, como la transcripción génica. Además, nuestro laboratorio describió la sobreexpresión de LOXL2 intracelular como un nuevo marcador pronóstico de carcinomas escamosos (SCC) de laringe, así como su asociación con la metástasis de carcinomas basales de mama. Con el objetivo de profundizar en las capacidades multifuncionales de LOXL2, en el presente estudio se han generado modelos genéticos de ganancia y pérdida de función de *Loxl2* en ratón. Los resultados obtenidos muestran que la delección constitutiva de *Loxl2* provoca letalidad perinatal asociada, en algunos casos, con defectos cardíacos congénitos y/o distensión de los vasos sanguíneos hepáticos. Por otro lado, la sobreexpresión constitutiva de *Loxl2* provoca esterilidad en machos debido a disfunciones en el epidídimo y degeneración testicular. La contribución de *Loxl2* a la progresión tumoral y la metástasis se ha estudiado en ambos modelos genéticos en dos sistemas experimentales: a) carcinogénesis química de piel inducida por DMBA/TPA, y b) el modelo de cáncer de mama *Polyoma Middle T* (*PyMT*). Los resultados obtenidos en la carcinogénesis de piel demuestran la implicación de *Loxl2* en la iniciación y progresión maligna actuando como inhibidor de la diferenciación de papilomas a través, al menos en parte, de la regulación negativa de la vía de señalización de Notch. Por otra parte, los estudios en el modelo *PyMT* demuestran un papel esencial de *Loxl2* para la generación de metástasis pulmonares y del nicho pre-metastásico, regulando la movilización de células progenitoras mieloides y la expresión de varias citoquinas, como *S100A8/S100A9*. Parte de las funciones de *Loxl2* durante la metástasis de cáncer de mama se ejercen a través de mecanismos intrínsecos a las células tumorales y de un modo independiente a la remodelación de la matriz extracelular (MEC) que rodea al tumor primario.

Cancer is the second cause of death in the world, being metastasis responsible for at least 90% of deaths caused by this disease. The process of metastasis involves different steps including invasion, dissemination, and colonization into distant organs. During carcinoma progression the loss of the epithelial phenotype and the acquisition of a mesenchymal phenotype, a process known as epithelial to mesenchymal transition (EMT), is considered essential for invasion and other metastatic steps. Loss of functional E-cadherin is a key event during EMT. Numerous transcription factors acting as E-cadherin repressors and EMT inducers have been described, including Snail1. Previous data from our group identified lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) as a positive regulator of Snail1 stability and EMT inducer, even independently of Snail1. LOXL2 belongs to the lysyl oxidase family, which is composed by several proteins whose classical function is to catalyze extracellular matrix (ECM) fibers crosslinking, participating in physiological and pathologic processes, such as fibrosis and cancer. However, during the last years, studies from our group and others have demonstrated the involvement of LOXL2 in intracellular processes, such as gene transcription. Moreover, our group described increased intracellular LOXL2 expression as a new prognosis marker of larynx squamous cell carcinomas (SCC), as well as its association with basal breast carcinoma metastasis. The aim of the present work was to further investigate the multifunctional LOXL2 abilities by generating genetic mouse models of gain and loss of function for *Loxl2*. The results obtained show that constitutive deletion of *Loxl2* causes perinatal lethality associated, in some cases, with congenital cardiac defects and/or hepatic blood vessels distension. On the other hand, constitutive *Loxl2* overexpression provokes male sterility due to epididymal dysfunction and testicular disorganization. The *Loxl2* contribution to tumor progression and metastasis has been studied using two different experimental systems: a) DMBA/TPA mouse skin carcinogenesis, and b) *Polyoma Middle T* (*PyMT*) breast tumor model. The obtained results demonstrate the involvement of *Loxl2* both in initiation and malignant progression of mouse skin carcinogenesis inhibiting papilloma differentiation, at least in part, through the negative regulation of the Notch signaling pathway. On the other hand, the studies performed in the *PyMT* model demonstrate an essential role for *Loxl2* in lung metastasis and pre-metastatic niche formation, through the regulation of myeloid progenitor cells mobilization and the expression of several cytokines, such as *S100A8/S100A9*. Importantly, during the metastatic process, *Loxl2* also acts through tumor cell intrinsic mechanisms and independently of primary tumor ECM remodeling.

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. La transición epitelio mesénquima y la metástasis.....	9
2. La familia de las lisil oxidasas (LOX).....	11
2.1 Clasificación, estructura y función básica de los miembros LOX.....	11
2.2 Regulación de la expresión de los genes LOX y LOX-like	13
2.3. Modificaciones postraduccionales y localización subcelular de los miembros LOX	14
2.4 Papel fisiológico de las lisil oxidasas.....	15
3. La familia LOX en patologías no tumorales.....	17
4. La familia LOX en patologías tumorales	19
4.1 La familia LOX en la supresión tumoral	19
4.2 La familia LOX en la progresión tumoral	19
4.3 LOXL2 y cáncer.....	21
4.3.1 LOXL2 en la diferenciación tumoral	21
4.3.2 LOXL2 y TEM en cáncer	22
4.3.3 LOXL2 y matriz extracelular en procesos tumorales	23
5. El nicho pre-metastático	24
5.1 Concepto de nicho pre-metastático y factores implicados.....	24
5.2. Papel de las proteínas LOX en la formación del nicho pre-metastático	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Plásmidos	35
1.1 Vector de recombinación homóloga de sobreexpresión de <i>Loxl2</i>	35
1.2 Vectores virales	36
2. Modelos de ratón.....	36
2.1. Generación del modelo genético de ratón knock-out (KO) condicional y constitutivo del gen <i>Loxl2</i>	36

2.2. Generación del modelo genético de ratón con sobreexpresión condicional y constitutiva del gen <i>Lox12</i>	37
2.3. Modelo tumoral de mama <i>PyMT</i> con delección y sobreexpresión condicional del gen <i>Lox12</i>	38
2.4. Ratones inmunodeprimidos	39
3. PCR diagnóstica y genotipado de ratones.....	39
3.1 PCR diagnóstica	39
3.2 PCR de genotipado	40
4. Líneas celulares y cultivos celulares.....	42
4.1 Línea celular HEK293T	42
4.2. Cultivo primario de MEFs	43
4.3. Cultivo primario de queratinocitos.....	43
4.4. Cultivo primario de células epiteliales derivadas de tumores <i>PyMT</i>	44
5. Transfecciones e infecciones lentivirales y adenovirales.....	44
6. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	44
6.1. Diferenciación <i>in vitro</i> de queratinocitos primarios.....	44
6.2. Curvas de crecimiento e inmortalización celular	45
6.3. Análisis del ciclo celular en MEFs	45
6.4. Ensayos de migración celular	45
6.5. Ensayo de estabilidad de proteínas.....	46
7. Estudios <i>in vivo</i>	46
7.1. Tratamiento de la piel con TPA	46
7.2. Carcinogénesis química de piel	46
7.3. Análisis por citometría de flujo de muestras de pulmón, sangre y médula ósea	46
7.4. Ensayos de metástasis espontánea y experimental.....	47
8. Procesamiento de tejidos.....	47
8.1. Generación de bloques de parafina	47
8.2. Generación de bloques de OCT	48

8.3. Tinción con hematoxilina/eosina	48
9. Análisis de la matriz extracelular.....	48
9.1. Tinción con rojo sirio	48
9.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	49
10. Detección de proteínas	49
10.1. Análisis de proteínas mediante Western blot	49
10.2. Análisis por inmunofluorescencia (IF)	50
10.3. Análisis por inmunohistoquímica (IHQ).....	50
11. Análisis de RNA mensajero.....	52
11.1. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA	52
11.2. Análisis de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa.....	53
11.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) ...	53
12. Análisis estadísticos.....	55
RESULTADOS	57
1. Generación del modelo de ratón transgénico condicional de sobreexpresión de <i>Lox12</i>	59
2. Caracterización fenotípica de los ratones modificados genéticamente para <i>Lox12</i>	60
2.1. Caracterización del ratón KO de <i>Lox12</i> ($L2^{-/-}$)	60
2.2. Caracterización fenotípica del ratón de sobreexpresión de <i>Lox12</i> ($R26^{L2/L2}$)	62
2.2.1. Defectos estructurales en los testículos y epidídimo.....	63
2.2.2. <i>Lox12</i> reprime cadherina-E y claudina-1 en el epidídimo	67
2.2.3. La sobreexpresión de <i>Lox12</i> provoca fibrosis en el epidídimo	68
3. Análisis de la ausencia y sobreexpresión de <i>Lox12</i> en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)	70
4. Efecto de la delección y sobreexpresión de <i>Lox12</i> en la homeostasis de la epidermis de ratón.....	71
4.1. Estudio de la piel de ratones neonatos $L2^{-/-}$ y $R26^{L2/L2}$	72
4.2. Cultivo y diferenciación <i>in vitro</i> de queratinocitos primarios derivados de los modelos transgénicos de <i>Lox12</i>	73
4.3. Efecto de <i>Lox12</i> sobre la hiperplasia epidérmica inducida por TPA.....	74

5. Estudio de la influencia de Loxl2 en la carcinogénesis química en piel	75
5.1. Latencia y desarrollo de las lesiones durante la carcinogénesis química	76
5.2. Análisis histológico de las lesiones	77
5.3. Papel de Loxl2 en la diferenciación de papilomas y la regulación de la ruta de Notch	79
6. Papel de Loxl2 en carcinomas de mama en el modelo tumoral <i>PyMT</i>	82
6.1. Implicación de Loxl2 en la progresión tumoral y la metástasis pulmonar	83
6.2. Estudio del papel de Loxl2 en la formación del nicho pre-metastático	87
6.2.1. Papel de Loxl2 en el reclutamiento de poblaciones celulares de la célula ósea.	87
6.2.2. Papel de Loxl2 en la regulación de la expresión de factores implicados en el nicho pre-metastático.....	89
6.3 Estudio de la contribución de Loxl2 a la metástasis mediante mecanismos intrínsecos a las células tumorales (" <i>cell autonomous</i> ")	91
6.4. Estudio de la influencia de Loxl2 en la organización de la MEC en tumores del modelo <i>PyMT</i>	93
DISCUSIÓN	95
1. La ausencia de Loxl2 provoca letalidad prenatal	97
2. La sobreexpresión de Loxl2 causa esterilidad en machos.....	98
3. Papel de Loxl2 en la homeostasis de la piel	102
4. Papel de Loxl2 durante la carcinogénesis química.....	104
5. Loxl2 en carcinomas de mama	108
5.1 Loxl2 en la progresión tumoral y la metástasis de carcinomas de mama.....	108
5.2 Efectos de Loxl2 en la generación del nicho pre-metastático.....	109
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXO	149

Abreviaturas

ACP: producto de condensación aldólica (*Aldol Condensation Product*)

AFM: microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*)

AP1/2: proteína activadora 1/2 (*Activator Protein 1/2*)

AR: receptor de andrógenos (*Androgen Receptor*)

ARG1: arginasa 1

BCA: ensayo del ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Assay*)

β-cat: β-catenina

BMDCs: células derivadas de la médula ósea (*Bone Marrow Derived Cells*)

BMP1: proteína morfogenética ósea 1 (*Bone Morphogenetic Protein 1*)

C3A: caspasa 3 A

Cad-E: cadherina-E

CAFs: fibroblastos asociados al cáncer (*Cancer Associated Fibroblasts*)

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico (*Cyclic Adenosin Mono Phosphate*)

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario (*Complementary Desoxy Ribonucleic Acid*)

CHX: cicloheximida

Cln-1: claudina 1

ColI/IV: colágeno I/IV

Col1A1/2: gen de colágeno 1 y 2

CRL: receptor de tipo citoquina (*Citokine Receptor Like*)

CTC: célula tumoral circulante (*Circulating Tumour Cell*)

dLNL: anhidro-lisino-norleucina (*dehydrolysinonorleucine*)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMBA: 7,12-dimetilbenza(a)antraceno

DNA: ácido desoxirribonucleico (*Desoxy Ribonucleic Acid*)

ECL: quimioluminiscencia aumentada (*Enhanced chemiluminescence*)

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EPC: célula progenitora endotelial (*Endothelial Progenitor Cell*)

ESC: célula madre embionaria (*Embryonic Stem Cell*)

ESR: receptor de estrógenos (*Estrogen Receptor*)

FAK: quinasa de adhesión focal (*Focal Adhesion Kinase*)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

FN: fibronectina

γ-cat: γ-catenina

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GM-CSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

H&E: hematoxilina & eosina

H3K4me3: lisina 4 trimetilada de la histona H3 (*trimethylated histone H3 at lysine 4*)

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 α*)

Hltf: factor de transcripción de tipo helicasa (*Helicase-like Transcription Factor*)

HPCs: células precursoras hematopoyéticas (*Hematopoietic Progenitor Cells*)

HRP: peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase*)

IF: inmunofluorescencia

IHQ: inmunohistoquímica

IL 1/6: interleuquina 1/6

IMC: célula mieloide inmadura (*Immature Myeloid Cell*)

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (*Inducible nitric oxide synthase*)

K1/5/10/15: citoqueratinas 1/5/14/15

KFL8: factor *kruppel-like 8*

KO: *knock-out*

LGL2: *lethal giant larvae homolog 2*

Lor: loricrina

LOX: lisil oxidasa

LOXL1-4: proteína similar a la lisil oxidasa tipo 1-4 (*Lysil Oxidase-like 1-4*)

LSCC: carcinoma escamoso de laringe (*Larynx Squamous Cell Carcinoma*)

LTQ: lisil-tirosil-quinona

Luc: luciferasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MDSCs: células supresoras mieloides (*Myeloid Derived Suppressor Cells*)

MEC: matriz extracelular

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts*)

MMP: metaloproteínasa de matriz (*Matrix MetalloProteinase*)

MMTV: virus del tumor de mama de ratón (*Mouse Mammary Tumor Virus*)

NES: señal de exportación nuclear (*Nuclear Export Signal*)

NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

OCT: *Optimal Cutting Temperature*

OIS: senescencia inducida por oncogenes (*Oncogene-Induced Senescence*)

P0/P1: día 0/1 post-natal

PBC: cirrosis biliar primaria (*Primary Biliary Cirrhosis*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PIGF: factor de crecimiento de placenta (*Platelet Derived Growth Factor*)

PP: propéptido

PR: receptor de progesterone (*Progesterone Receptor*)

PRR: región rica en residuos de prolina (*Proline-Rich Region*)

PyMT: *Polyoma Midde T*

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real (*quantitative Real Time-PCR*)

R26: Rosa26

RAMP3: proteína 3 modificadora de la actividad del receptor (*Receptor Activity-Modifying Protein 3*)

RNA: ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

ROS: especie reactiva de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

RT: transcripción inversa (*Reverse Transcription*)

SC: célula madre (*Stem Cell*)

SCC: carcinoma de células escamosas (*Squamous Cell Carcinoma*)

SCF: factor de células madre (*Stem Cell Factor*)

SA: *splicing acceptor*

SRCR: receptor *scavenger* rico en residuos de cisteína (*scavenger receptor cysteine-rich*)

TAMs: macrófagos asociado al tumor (*Tumor Associated Macrophage*)

TEM: transición epitelio mesénquima

TEM-TF: factor de transcripción inductor de transición epitelio mesénquima

TGF- β : factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor- β*)

TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (*Tissue Inhibitor of MetalloProteinases1*)

TME: transición mesénquima epitelio

TPA: ester de forbol 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR1: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*)

WB: *Western-blot*

WT1: *Wilms tumor 1*

Introducción



1. LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA Y LA METÁSTASIS.

La metástasis es responsable de al menos el 90% de las muertes causadas por tumores en humanos. Se considera que se origina a partir de un reducido grupo de células del tumor primario que adquieren la capacidad de colonizar órganos distantes. Este proceso conlleva una serie de etapas que implican: invasión de las células tumorales a los tejidos adyacentes, intravasación en la sangre o vasos linfáticos y su diseminación, extravasación en órganos y posterior colonización de los mismos (Gupta and Massague, 2006).

En el proceso de invasión, las células tumorales sufren profundos cambios a nivel de la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, perdiendo su morfología epitelial y adquiriendo propiedades proteolíticas y migratorias que les permiten invadir tejidos adyacentes (Figura 1). En los carcinomas, estos cambios coordinados en las células tumorales son reminiscentes del proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) (Thiery et al., 2009). La TEM tiene un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, cuando células de origen epitelial migran para generar nuevos tejidos. Los procesos de TEM son necesarios, por ejemplo, para la gastrulación y la formación del endodermo parietal, así como para la migración de células de la cresta neural y la formación de una gran variedad de órganos y tejidos como el corazón, sistema musculo-esquelético y el sistema nervioso periférico (Shook and Keller, 2003; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009). Actualmente, en el contexto de la tumorigénesis, se considera que la TEM es un proceso transitorio, siendo las células capaces de recuperar su morfología epitelial en los órganos diana de la metástasis mediante un proceso inverso conocido como transición mesénquima-epitelio (TME) (Nieto and Cano, 2012; Nieto, 2013; Thiery, 2002). Además, durante los últimos años, la TEM también ha sido relacionada con la adquisición de propiedades de células madre (*stemness*) (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008) y con otras patologías como la fibrosis renal o cardíaca (Thiery et al., 2009).

Durante la TEM, las células epiteliales sufren la disolución de los contactos célula-célula y pierden la polaridad apico-basal debido a la desorganización de las uniones adherentes, uniones estrechas, y desmosomas. En su lugar, las células comienzan a expresar marcadores mesenquimales y reorganizan su citoesqueleto para adquirir capacidades invasivas basándose en la migración y la remodelación del microambiente local (Figura 1) (Thiery, 2002; Thiery et al., 2009; Yang and Weinberg, 2008). Una de las moléculas más relevantes implicadas en la adhesión intercelular es la cadherina-E. La cadherina-E es el miembro prototípico de la familia de cadherinas, esencial para el establecimiento y mantenimiento de los epitelios, mediando la adhesión célula-célula dependiente de calcio por complejos cadherina-E/cateninas que se

anclan al citoesqueleto de actina (Takeichi, 1991). Su pérdida es frecuente en muchos carcinomas (Birchmeier and Behrens, 1994) y representa un evento clave durante la TEM (Peinado et al., 2004; Thiery, 2002). Numerosos factores de transcripción han sido identificados como represores, directos e indirectos, de cadherina-E e inductores de TEM (TEM-TFs). Entre éstos se encuentran factores de dedos de zinc de las familias Snail (Snail1 y Snail2) y Zeb (ZEB1 y ZEB2) (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005; Grooteclaes and Frisch, 2000; Hajra et al., 2002), factores bHLH como E47, E2-2 y Twist1 (Perez-Moreno et al., 2001; Sobrado et al., 2009; Yang et al., 2004) y más recientemente los factores Kruppel-like 8 (KLF8), Goosecoid o FoxC2 (Hartwell et al., 2006; Mani et al., 2007; Wang et al., 2007). El mecanismo de represión de cadherina-E mediante Snail, E47 y los factores Zeb implica la unión directa de estos factores al promotor proximal de cadherina-E (Peinado et al., 2007), mientras que E2-2, Twist1, Goosecoid y FoxC2 lo hacen de un modo indirecto (Casas et al., 2011; Hartwell et al., 2006; Mani et al., 2007; Sobrado et al., 2009).

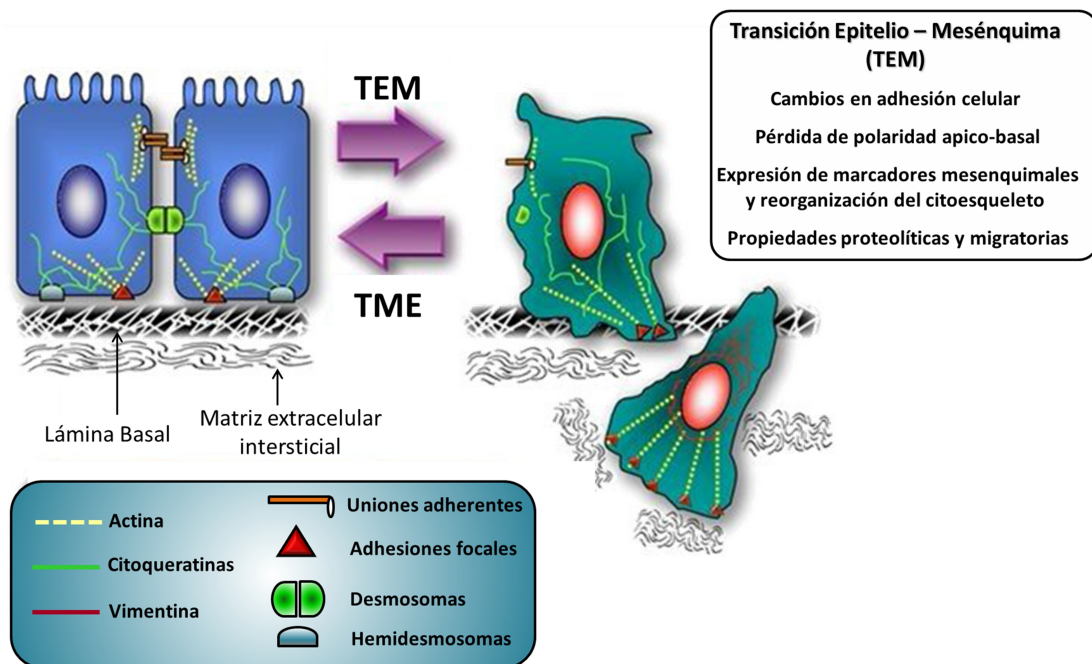


Figura 1. Esquema de los principales cambios durante la transición epitelio-mesénquima (TEM). Durante la TEM, las células epiteliales pierden los contactos célula-célula y cambian las propiedades de adhesión célula-matriz extracelular, siendo capaces de atravesar la lámina basal y adquirir propiedades proteolíticas y migratorias. En el proceso, las células adquieren un fenotipo mesenquimal acompañado de una reducción de citoqueratinas, así como un incremento de vimentina y de la reorganización de las fibras de actina. El proceso de TME implica la reversión al fenotipo epitelial. Adaptado de Sarrió, 2007.

Durante las dos últimas décadas, el conocimiento acerca de los mecanismos de acción y regulación de los TEM-TFs ha aumentado sustancialmente. En lo que se refiere a las proteínas Snail, han sido descritos diversos mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-

traduccionales como importates reguladores de su funcionalidad (Bachelder et al., 2005; De Craene and Berx, 2013; Dominguez et al., 2003; Yook et al., 2005). La estabilidad de Snail1 y su localización subcelular está controlada por varios eventos de fosforilación que implican a algunas quinasas como GSK3 β , CK2, PKA y Lats2 (Lamouille et al., 2014; MacPherson et al., 2010; Zhang et al., 2012; Zhou et al., 2004). Estudios de nuestro laboratorio identificaron a la lisil oxidasa-like 2 (LOXL2), y en menor medida a la lisil oxidasa-like 3 (LOXL3), como moduladores positivos de la estabilidad de Snail1 y la consecuente inducción de TEM (Peinado et al., 2005a). LOXL2 interacciona con Snail1 y ambos colocan en la región perinuclear. Esta asociación le permitiría modificar potencialmente dos residuos de lisina específicos (K98 y K137) localizados en la región de destrucción y de exporte nuclear (NES) de Snail1, atenuando así su degradación mediada por GSK3 β (Peinado et al., 2005a; Peinado et al., 2005b). Adicionalmente, LOXL2 es capaz de inducir, por si misma, un proceso de TEM (Peinado et al., 2005a). Estos estudios confirieron por primera vez a LOXL2 un papel durante la TEM y la progresión tumoral.

2. LA FAMILIA DE LAS LISIL OXIDASAS (LOX).

2.1. Clasificación, estructura y función básica de los miembros LOX.

La familia de las lisil oxidasas está compuesta por la lisil oxidasa prototípica (LOX) y cuatro miembros “LOX-like” (LOXL1-4) (Figura 2) (Csiszar, 2001; Kagan and Li, 2003; Kim et al., 2011; Lucero and Kagan, 2006). Todos los miembros de la familia comparten una región C-terminal altamente conservada que contiene el dominio catalítico. Esta región incluye tres residuos de histidina (H292, H294, H296 en LOX) encargados de coordinar un átomo de Cu²⁺, esencial para la catálisis y que se piensa que también es necesario para la formación del cofactor lisil-tirosil-quinona (LTQ) (Lucero and Kagan, 2006). Además, también incluye un receptor de tipo citoquina (CRL) cuya función todavía no ha sido estudiada en profundidad (Figura 2). La parte N-terminal es más divergente entre los diferentes miembros de la familia y se cree que puede determinar la acción específica de cada proteína. Todas ellas contienen en este extremo un péptido señal (PS), pero mientras que LOX incluye una secuencia propéptido (PP) que se elimina tras su secreción, LOXL1 presenta una región rica en residuos de prolina (PRR) con una función desconocida (Csiszar, 2001). Por su parte, LOXL2, LOXL3 y LOXL4 contienen cuatro dominios de tipo *scavenger* ricos en residuos de cisteína (SRCR), probablemente implicados en interacciones proteína-proteína (Figura 2). Este tipo de dominios se encuentra en algunos receptores de macrófagos que tienen la capacidad de unirse a proteínas que componen la matriz extracelular (MEC) (Csiszar, 2001; Lucero and Kagan, 2006; Maki and Kivirikko, 2001;

Maki et al., 2001; Saito et al., 1997; Uzel et al., 2001). Sin embargo, las funciones de los SRCR en las proteínas LOX están todavía por elucidar.

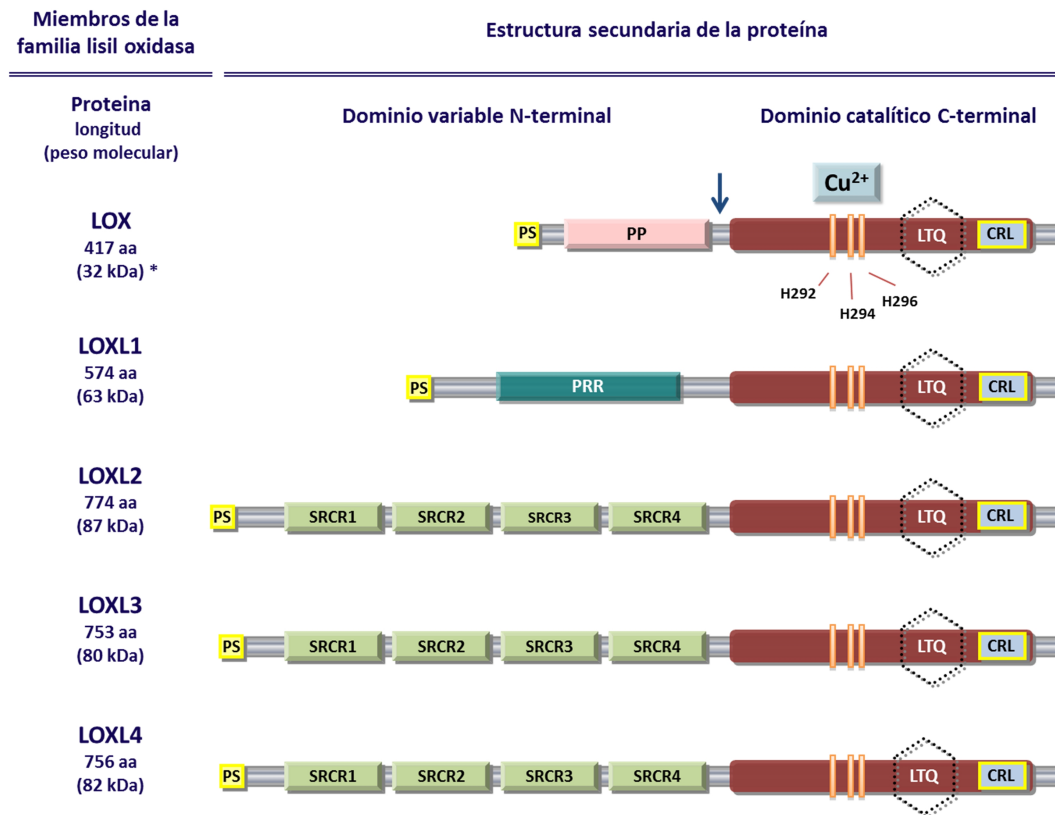


Figura 2. Representación esquemática de los miembros de la familia lisil oxidasa y sus dominios estructurales. Todos los miembros tienen homología en la parte carboxilo-terminal, correspondiente al dominio catalítico (marrón). CRL: receptor de tipo citoquina; LTQ: cofactor lisil-tirosil-quinona; Cu²⁺: átomo de cobre coordinado por tres residuos de histidina (indicando sus posiciones para LOX). En el extremo amino-terminal, LOX tiene una secuencia pro-péptido (PP) que se elimina durante el procesamiento de la proteína. LOXL1 contiene una región rica en residuos de prolina (PRR). LOXL2, LOXL3 y LOXL4 tienen cuatro dominios de tipo scavenger, ricos en cisteína (SRCR1-4). En todas las proteínas de la familia está presente en la parte N-terminal un péptido señal (PS). *LOX es sintetizada como una proenzima de 50 kDa (Pro-LOX) que se secreta a la matriz extracelular (MEC) donde es procesada proteolíticamente (flecha) en una enzima funcional de 32 kDa y en un propéptido de aproximadamente 18-kDa. Adaptado de Cano et al., 2012.

Las lisil oxidasas son enzimas cuya función bioquímica clásica es la remodelación de la matriz extracelular (MEC) a través de la generación de entrecruzamientos entre fibras tanto de colágeno como de elastina. Las fibras de colágeno están compuestas por fibrillas que son el resultado de la unión de varias moléculas solubles de colágeno. La red de elastina se compone de moléculas de tropoelastina ensambladas entre sí (Alberts B., 2002). La actividad catalítica de las lisil oxidasas convierte los precursores solubles de estas proteínas en fibras insolubles (Csiszar, 2001). El mecanismo para llevar a cabo esta función se basa en la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de residuos de lisina o hidroxilisina localizados en los extremos amino y carboxilo-terminal de las formas inmaduras del colágeno (tropocolágeno) y la elastina.

Para esta reacción, el cofactor LTQ juega un papel crucial como aceptor de los electrones del proceso oxidativo que lleva consigo la liberación de una molécula de H_2O_2 . El aldehído resultante reacciona espontáneamente con otro residuo de lisina o hidroxilisina (que pueden estar desaminadas o no), finalizando así el proceso de entrecruzamiento (Figura 3) (Kagan and Li, 2003; Lucero and Kagan, 2006). La actividad catalítica de LOX puede ser inhibida irreversiblemente por β -aminopropionitrilo (BAPN) mediante su unión covalente al dominio catalítico (Kagan, 1994; Pinnell and Martin, 1968). Sin embargo, otros miembros de la familia como LOXL2 no son sensibles a este inhibidor *in vivo* (Kim et al., 2011; Vadasz et al., 2005), sugiriendo que las lisil oxidasas tendrían diferencias mecanísticas en su actividad catalítica.

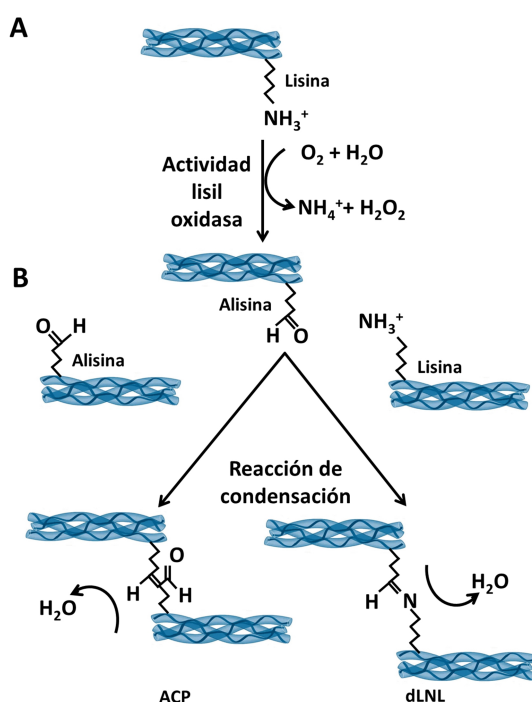


Figura 3. Esquema de la reacción catalizada por la actividad lisil oxidasa entre moléculas de colágeno. (A) Un residuo de lisina del extremo de una molécula de colágeno (triple hélice de tropocolágeno) es desaminado oxidativamente gracias a la catálisis llevada a cabo por las proteínas de la familia lisil oxidasa. La reacción convierte el grupo ϵ -amino en un aldehído, liberándose durante el proceso un grupo amonio y una molécula de peróxido de hidrógeno. (B) El aldehído resultante puede condensarse con otra lisina desaminada (alisina) generando un producto de condensación aldólica (ACP: *aldol condensation product*). Alternativamente, el aldehído generado también puede condensarse con un residuo de lisina sin modificar para formar un entrecruzamiento de tipo anhidro-lisino-norleucina (dLNL). Ambas reacciones llevan consigo la liberación de una molécula de agua.

2.2. Regulación de la expresión de los genes *LOX* y *LOX-like*.

Numerosos factores han sido descritos como reguladores de los genes *LOX* y *LOXL*. Estos incluyen a: factores de crecimiento y citoquinas, como por ejemplo el factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1 y 2) y el factor de crecimiento con actividad transformante (TGF- β); hormonas, como progesterona, testosterona y prostaglandina; y moléculas de señalización, como Ras o cAMP (Csiszar, 2001). El análisis del promotor de *LOX* y *LOXL2* ha revelado sitios putativos de unión de factores de transcripción como AP1, AP2 o NF κ B, algunos de ellos también presentes en los promotores de genes del colágeno (*COL1A1* y *COL1A2*) (Csiszar, 2001; Fong et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo de regulación que ha sido más estudiado para algunos de los miembros de la familia *LOX* es la inducción de la expresión mediada por

hipoxia. De hecho, el factor de transcripción HIF-1 α se une directamente a los promotores de *LOX*, *LOXL2* y *LOXL4* induciendo su expresión (Bignon et al., 2011; Erler et al., 2006; Schietke et al., 2010; Wong et al., 2011).

2.3. Modificaciones postraduccionales y localización subcelular de los miembros LOX.

Todas las proteínas de la familia Lox pueden ser secretadas al medio extracelular. LOX y LOXL1 lo hacen como proproteínas (proLOX y proLOXL1, respectivamente) que son procesadas proteolíticamente a través de la proteinasa BMP1 ("*bone morphogenetic protein 1*"), de manera que al liberarse la parte terminal del propéptido adquieren la capacidad catalítica (Borel et al., 2001; Cronshaw et al., 1995; Csiszar, 2001; Kagan and Li, 2003; Panchenko et al., 1996). Esta misma proteinasa procesa el procógeno al colágeno sustrato de LOX (Siegel, 1974), indicando que LOX y LOXL1 actúan mediante un mecanismo altamente integrado. Si LOXL2, LOXL3 y LOXL4 son secretadas también como proenzimas que tienen que procesarse para ser activas es una cuestión todavía por esclarecer.

Además de encontrarse en el medio extracelular, algunos miembros de la familia LOX han sido detectados en varios compartimentos subcelulares, sugiriendo funciones adicionales de estas proteínas. LOX madura puede translocarse al núcleo de células de músculo liso vascular (VSMCs) y fibroblastos mediante un proceso de internalización de la forma secretada (Li et al., 1997; Nellaiappan et al., 2000). Además, LOX se localiza en el citoplasma de algunas células epiteliales polarizadas (Jansen and Csiszar, 2007). LOX y LOXL1 también se han encontrado en el núcleo celular de numerosos tejidos embrionarios y adultos de ratón (Hayashi et al., 2004). LOXL2, por su parte, ha sido detectada en otros compartimentos subcelulares como el citoplasma, núcleo y región perinuclear (Cano et al., 2012). Recientemente, se ha propuesto la existencia de un posible receptor de membrana que podría internalizar a LOXL2 previamente secretada (Lugassy et al., 2012).

La *N*-glicosilación juega un papel importante en la secreción, localización y funcionalidad de algunas proteínas LOX. El precursor proLOX es glicosilado en el extremo N-terminal antes de ser procesado (Trackman et al., 1992) y aunque esta modificación no es necesaria para la secreción de la proteína, sí lo es para que el enzima tenga una actividad óptima (Grimsby et al., 2010). Recientemente, también han sido estudiadas las modificaciones postraduccionales de LOXL2 y sus efectos en la secreción. En células de mama MFC7, la forma secretada de LOXL2 es *N*-glicosilada en dos residuos de asparagina (N-455 y N-644) a diferencia de la intracelular que no lo está (Moon et al., 2013; Xu et al., 2013). Las modificaciones post-traduccionales de LOXL3

y LOXL4 han sido menos estudiadas y únicamente se sabe que tienen algunos residuos putativos de glicosilación (Maki and Kivirikko, 2001; Maki et al., 2001).

2.4. Papel fisiológico de las lisil oxidasas.

Dada la relación de los miembros de la familia LOX con la remodelación de la MEC, el análisis de la expresión en distintos tejidos muestra un patrón bastante amplio. *LOX* y *LOXL1* se expresan en altos niveles en corazón, aorta, placenta, piel, pulmón, riñón y músculo esquelético (Csiszar, 2001; Kim et al., 1995). Se han detectado altos niveles de mRNA de *LOXL2* en útero, testículo, placenta, próstata, corazón, aorta, timo, riñón, pulmón, piel y epitelio mamario (Barker et al., 2011; Csiszar, 2001; Jourdan-Le Saux et al., 2000). *LOXL3* se expresa en altos niveles en cerebro, corazón y útero, mientras que *LOXL4* se ha detectado en páncreas y testículos (Asuncion et al., 2001; Csiszar, 2001). El desarrollo de modelos animales de pérdida de función (KO: *knock out*) para algunos de estos genes ha ayudado a esclarecer cual es el papel biológico de algunas de estas enzimas en la fisiología del organismo. Hasta el momento, sólo han sido generados y caracterizados modelos de ratón deletéreos para *Lox* y *Loxl1*. La delección de *Lox* provoca letalidad perinatal debido a aneurismas aórticos, disfunción cardiovascular y ruptura diafragmática (Hornstra et al., 2003; Maki et al., 2002; Warburton and Shi, 2005). La pared de la aorta de los ratones KO de *Lox* es más delgada y las fibras elásticas de las capas de células musculares lisas están fragmentadas y en una disposición discontinua. Además, *Lox* también es esencial para mantener la integridad de las fibras de colágeno y elastina del pulmón y la piel (Maki et al., 2005). La delección de *Loxl1* en ratón reveló que, a pesar de no afectar a la viabilidad de los animales, este miembro de la familia es requerido para la correcta deposición de las fibras de elastina en el útero, pulmón, piel y aorta, mediante un mecanismo dependiente de fibulina-5 (Liu et al., 2004). En relación con *LOXL2*, aparte de su papel en TEM (ver apartado 1), se sabe que está implicada en la proliferación y migración de células endoteliales y es necesaria durante la angiogénesis, participando en el ensamblaje del colágeno IV de la membrana basal del endotelio mediante un mecanismo dependiente de hipoxia (Bignon et al., 2011). Datos adicionales apuntan a que la expresión de *Loxl2* está asociada con la involución de la glándula mamaria de ratón y señalan que podría participar en la remodelación de la MEC durante este proceso (Barker et al., 2011). Por último, estudios recientes demostraron que *LOXL4* contribuye a la remodelación de la matriz vascular mediante un mecanismo dependiente de TGF- β 1 (Busnadiego et al., 2013).

Aparte de todas estas funciones basadas en la remodelación directa de la MEC, algunos miembros de la familia LOX se han implicados en otros procesos, algunos de ellos

intracelulares. De hecho, LOX se relaciona con la transcripción de algunos genes (Giampuzzi et al., 2000), la remodelación de la cromatina (Giampuzzi et al., 2003; Kagan et al., 1983), la quimiotaxis dependiente del H_2O_2 producido en la catálisis (Li et al., 2000), o la diferenciación de algunos tipos celulares como osteoblastos y adipocitos (Huang et al., 2009; Pischon et al., 2009). Respecto a LOXL2, recientemente se ha descrito un papel como regulador transcripcional mediante mecanismos epigenéticos (Herranz et al., 2012; Millanes-Romero et al., 2013). La actividad enzimática de la proteína permite desaminar la lisina 4 trimetilada de la histona 3 (H3K4me3) en regiones como el promotor de *cadherina-E*. Durante esta reacción, se eliminan los grupos metilo de la H3K4, asociados a transcripción activa, reprimiendo de esta manera la expresión del gen (Herranz et al., 2012). Adicionalmente, se ha propuesto que LOXL2, en asociación con Snail1, contribuye a la TEM al reprimir la transcripción de “*major satélites*” de la heterocromatina centromérica, cuya desregulación se asocia con la inducción de TEM (Millanes-Romero et al., 2013). No obstante, estudios recientes de nuestro grupo indican que la actividad catalítica de LOXL2 es dispensable para la represión de cadherina-E y genes de polaridad celular, así como para la inducción de TEM (Cuevas et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011).

En los últimos años, varios estudios han señalado el papel de LOX y LOXL2 en la diferenciación de queratinocitos de la piel (Fujimoto and Tajima, 2009; Le Provost et al., 2010; Lugassy et al., 2012; Peinado et al., 2008). La epidermis es un epitelio estratificado que constituye una barrera esencial de protección contra agresiones externas. Las células que la componen están ancladas a la lámina basal gracias a hemidesmosomas (integrinas $\alpha 6\beta 4$) y contactos focales (integrinas $\alpha 3\beta 1$). La epidermis está compuesta de cuatro capas de células: basal, espinosa, granular y cornificada, que se corresponden con los pasos secuenciales de proliferación y diferenciación de queratinocitos (Figura 4) (Fuchs and Green, 1980; Fuchs, 1990). Los queratinocitos de la capa basal se dividen y se desplazan hacia la capa superior dejando de expresar las integrinas que las unen a la lámina basal y las citoqueratinas 5 y 14 (K5 y K14). De este modo, las células pasan a formar parte de la capa espinosa, caracterizada por la expresión de marcadores de diferenciación temprana como citoqueratina 1 y 10 (K1 y K10), entre otros. En los estratos más diferenciados de la capa espinosa comienza a sintetizarse involucrina, y la migración hacia la capa granular va acompañada de la síntesis de marcadores de diferenciación tardía como filagrina y loricrina. La diferenciación terminal de los queratinocitos resulta en la formación de una capa cornificada de células muertas altamente cohesivas que van eliminándose por descamación (Figura 4) (Fuchs and Green, 1980; Fuchs, 1990). Es importante destacar que las células de la capa basal y suprabasal expresan

cadherina-E como principal componente de adhesión intercelular, mientras que cadherina-P está restringida sólo a la capa basal, estando las capas suprabasales enriquecidas en desmosomas (Perez-Moreno et al., 2003). Estudios de expresión de mRNA sugirieron la existencia de una regulación recíproca de LOX y LOXL2 en la adhesión célula-MEC y durante la diferenciación terminal de queratinocitos (Fujimoto and Tajima, 2009). *LOXL2* se expresa en las capas basales de la epidermis, mientras que *LOX* es mucho más abundante en los estratos superiores (Figura 4). *LOXL1*, sin embargo, tiene una localización uniforme a lo largo de toda la epidermis (Fujimoto and Tajima, 2009; Noblesse et al., 2004). Análisis *in vitro* llevados a cabo en queratinocitos mostraron que LOX es un potenciador de la diferenciación terminal (Le Provost et al., 2010), mientras que LOXL2 inhibe el proceso de queratinización y diferenciación epidérmica independientemente de su actividad catalítica (Lugassy et al., 2012; Peinado et al., 2008). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún estudio *in vivo* que confirme la implicación de ambas proteínas durante la diferenciación de la epidermis, ni datos que arrojen luz sobre el mecanismo responsable.

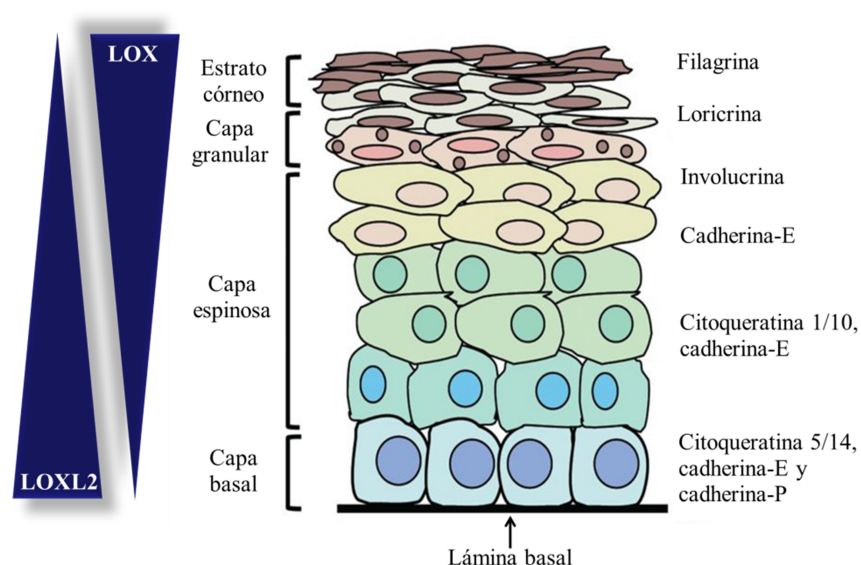


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la epidermis y de la expresión de LOX y LOXL2. El esquema representa la distintas capas que componen la epidermis, así como las principales proteínas marcadoras que se expresan en cada uno de los estratos. Además, se muestra el patrón de expresión de *LOX*, detectado en los estratos superiores, y *LOXL2* que queda más restringido a la capa basal. Adaptado de Nowel and Radtke, 2013.

3. LA FAMILIA LOX EN PATOLOGÍAS NO TUMORALES.

El amplio patrón de expresión de cada uno de los miembros de la familia LOX sugiere que la expresión anormal de estas proteínas podría estar asociada con la aparición de desórdenes relacionados principalmente con la regulación de la MEC. La reducción de la actividad lisil oxidasa ha sido detectada en varias patologías humanas hereditarias como la enfermedad de Menkes, el síndrome del cuerno occipital o el síndrome de Ehlers Danlos (Kuivaniemi et al., 1985; Maki, 2009; Royce et al., 1980). Todas están causadas por mutaciones que afectan a la

disponibilidad del cobre y que, por tanto, merman la capacidad catalítica mediada por LOX, provocando numerosas anormalidades en el tejido conjuntivo y sistema nervioso (Maki, 2009; Poulsen et al., 2002). Aunque las lisil oxidasas están implicadas en estos síndromes, no se han identificado mutaciones hasta la fecha en ninguno de los miembros de la familia que predispongan a ellos (Maki, 2009). Sin embargo, mutaciones asociadas al gen *LOXL1* han sido recientemente relacionadas con enfermedades que provocan la deposición anormal de fibras elásticas como el síndrome de pseudoexfoliación (Thorleifsson et al., 2007), causante de problemas elásticos sistémicos que afectan al ojo, corazón, pulmón, hígado y riñón, entre otros (Ritch, 2008; Tarkkanen, 2008). Los bajos niveles de expresión y/o actividad catalítica de algunos miembros LOX también han sido asociados a otras enfermedades humanas como la cutis laxa congénita (Khakoo et al., 1997) o la predisposición a padecer aneurismas aórticos (Remus et al., 2012; Rodriguez et al., 2008; Sibon et al., 2005).

Varios estudios han indicado que algunos miembros de la familia LOX se expresan en altos niveles en procesos fibróticos de amplio espectro en hígado, corazón, pulmón, arterias, dermis y riñón (Gambichler and Skrygan, 2013; Kagan, 1994; Maki, 2009; Siegel et al., 1978; Smith-Mungo and Kagan, 1998; Voloshenyuk et al., 2011). Así, altos niveles de *LOX* y *LOXL2* han sido asociados con la enfermedad de Wilson y con cirrosis biliar primaria (PBC) (Vadasz et al., 2005). Estas enfermedades se caracterizan por alteraciones en el metabolismo del cobre que provocan un fallo hepático progresivo acompañado de fibrosis (Gitlin, 2003; Takeshima et al., 1993). Los altos niveles de *LOX* y *LOXL2* detectados en hepatocitos de hígados fibróticos están asociados con un aumento de la deposición de colágeno alrededor de los mismos y con daño oxidativo de proteínas de la superficie celular (Vadasz et al., 2005). La participación de *LOXL2* en las citadas patologías se ha demostrado en estudios *in vivo* en los que anticuerpos específicos desarrollados contra *LOXL2* reducen significativamente procesos de fibrosis hepática y pulmonar inducidos por agentes químicos (Barry-Hamilton et al., 2010; Rodriguez et al., 2010). Además, trabajos recientes han mostrado que la expresión de *LOXL2* mediada por HIF-1 α también favorece el desarrollo de fibrosis renal (Higgins et al., 2007).

Por último, cabe destacar que *LOX* también se ha vinculado con desórdenes neurodegenerativos en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer y demencia (Gilad et al., 2005; Li et al., 2004). Esto sugiere que las lisil oxidasas podrían participar en patologías que no conllevan necesariamente problemas en el tejido conjuntivo.

4. LA FAMILIA LOX EN PATOLOGÍAS TUMORALES.

Durante los últimos años, el número de estudios que implican a las lisil oxidasas en diferentes tipos de cáncer se ha incrementado significativamente. Aunque la mayoría de ellos les atribuyen un papel como moduladores positivos de la progresión tumoral y la metástasis, otros trabajos han sugerido que también pueden actuar como supresores tumorales en algunos contextos (Barker et al., 2012; Payne et al., 2007).

4.1. La familia LOX en la supresión tumoral.

LOX fue propuesta en primer lugar como un gen supresor de tumores que inhibía los efectos de la transformación celular mediada por *ras* (Contente et al., 1990; Giampuzzi et al., 2001; Kenyon et al., 1991). El mecanismo propuesto implicaba al propéptido de 18 kD (LOX-PP), liberado tras el procesamiento de la proteína, que inhibiría vías de señalización que conducen a la activación del factor NF- κ B (Palamakumbura et al., 2004). Min et al., demostraron por primera vez *in vivo* que LOX-PP revertía el fenotipo invasivo del cáncer de mama de tipo Her-2/neu (Min et al., 2007). Además, trabajos más recientes demostraron que la ausencia de LOX en carcinomas basales y escamosos de piel inducía un fenotipo más agresivo y estaba asociada a mal pronóstico (Bouez et al., 2006). En esta misma línea, se han observado también bajos niveles de LOX en tumores de colon (Csiszar et al., 2002) y carcinomas gástricos (Kaneda et al., 2004). Algunos estudios también han sugerido una posible relación de LOXL1 y LOXL4 con la supresión tumoral en cáncer de vejiga (Wu et al., 2007). Con respecto a LOXL2, fibroblastos de rata transformados con RAS mostraron tener bajos niveles de mRNA de esta lisil oxidasa (Zuber et al., 2000). Del mismo modo, su baja expresión se ha relacionado con cáncer de próstata, ovario, adenocarcinomas de pulmón y carcinomas escamosos (SCC) de cabeza y cuello (Ono et al., 2000; Rost et al., 2003; Schmidt et al., 2007; Zhan et al., 2012). Sin embargo, ninguno de estos estudios muestra una correlación clínico-patológica de los pacientes con los niveles de LOXL2.

4.2. La familia LOX en la progresión tumoral.

A pesar del papel inicial de LOX como supresor tumoral, durante la última década, la contribución de los miembros de la familia lisil oxidasa en el desarrollo del cáncer y la metástasis se ha ido haciendo cada vez más evidente. Numerosos trabajos muestran que la expresión de LOX correlaciona con la metástasis y la baja supervivencia en pacientes con tumores de mama de alto grado (Erler et al., 2006), próstata (Lapointe et al., 2004), riñón (Stassar et al., 2001; Takahashi et al., 2001), colon (Baker et al., 2011), y en SCC de cabeza y

cuello (Erler et al., 2006). *LOX* está sobreexpresada en líneas de cáncer de mama altamente invasivas y su silenciamiento provoca la reversión a un fenotipo menos agresivo (Kirschmann et al., 2002). Se ha propuesto que *LOX* es capaz de regular la migración y la adhesión celular a través de la activación de las quinasas FAK y Src mediante un mecanismo dependiente del H_2O_2 producido por su actividad enzimática (Payne et al., 2005; Payne et al., 2006). Del mismo modo, se ha comprobado que la expresión de *Lox* en tumores de mama está controlada por hipoxia a través de HIF-1 α y su inhibición reduce la formación de metástasis en modelos ortotópicos de ratón (Erler et al., 2006). Por otro lado, dada la función biológica de *LOX* en la remodelación de la MEC, su participación en la regulación del estroma tumoral también ha sido estudiada. El entrecruzamiento de las fibras de colágeno mediado por *LOX* aumenta la tensión o rigidez ("*stiffness*") que rodea al tumor de mama facilitando su malignización (Levental et al., 2009). Esto es posible gracias al proceso mecanotransductor llevado a cabo por integrinas que activan numerosas vías de señalización, como PI3K (Mouw et al., 2014), favoreciendo el comportamiento invasivo de las lesiones (Figura 5). La inhibición de *LOX* en modelos murinos de cáncer de mama reduce la fibrosis del tejido y la progresión maligna del tumor (Levental et al., 2009). Recientemente, *LOX* ha sido relacionada con la regulación de la senescencia inducida por el estrés oncogénico (OIS) mediante la activación de la vía de FAK. Así, la actividad catalítica de *LOX*, acelera la salida de OIS *in vivo* en un modelo agresivo de adenocarcinoma ductal de páncreas (Wiel et al., 2013).

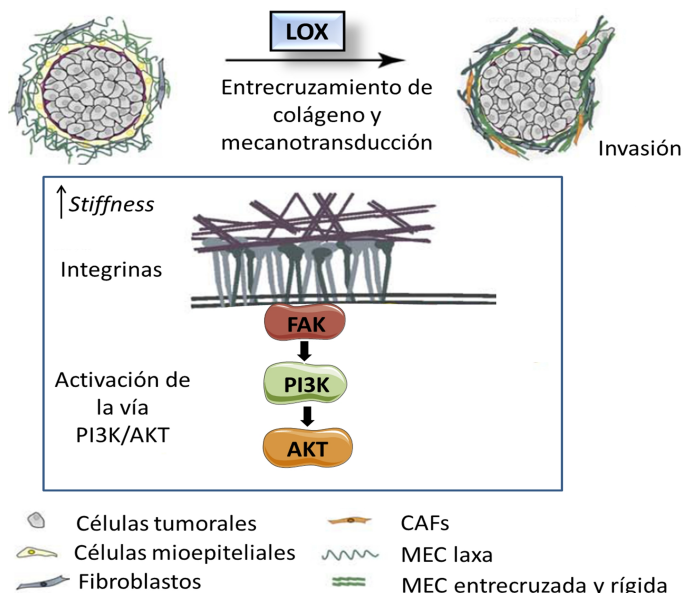


Figura 5. Representación esquemática de la relación entre el aumento del entrecruzamiento del colágeno y la malignización tumoral. La actividad catalítica de *LOX* aumenta el entrecruzamiento de las fibras de colágeno que rodean al tumor, llevando consigo un aumento de la rigidez (*stiffness*) de la MEC y una activación de los fibroblastos asociados al tumor (CAFs). Este proceso favorece el reclutamiento de integrinas y el ensamblaje de adhesiones focales que activan la vía PI3K y estimulan la potencial señalización PI3K>Akt, resultando en la adquisición de un fenotipo invasivo. Adaptado de Levental et al., 2009.

Muy pocos estudios han mostrado alteraciones en la expresión de LOXL1, LOXL3 y LOXL4 en cáncer. Algunos trabajos muestran que la sobreexpresión de LOXL4 en SCC de cabeza y cuello correlaciona con metástasis (Gorogh et al., 2007; Holtmeier et al., 2003). Además, este

miembro se relaciona con hipoxia en tumores colorectales (Kim et al., 2009). Sin embargo, no existen pruebas funcionales que la impliquen directamente en la progresión de estos carcinomas. En cambio, la participación de LOXL2 en cáncer se ha demostrado en numerosos trabajos. Por ello, y porque es el objeto de esta tesis, a continuación se explicará con más detalle lo que hasta ahora se conoce del papel de LOXL2 en la progresión tumoral.

4.3. LOXL2 y cáncer.

LOXL2 es una de las proteínas de la familia lisil oxidasa más estudiadas durante los últimos años y su expresión se ha asociado con diversos tumores (Tabla 1). Ha sido implicada en procesos relacionados con el cáncer como angiogénesis, diferenciación, TEM, remodelación de la matriz extracelular, hipoxia y la formación del nicho pre-metastásico (Barker et al., 2012; Canesin et al., 2014; Cano et al., 2012; Peinado et al., 2008; Wong et al., 2011).

Tabla 1. Resumen de la expresión de LOXL2 en tumores humanos.

Tumor	RNA/proteína	Expresión y características clínico patológicas	Referencias
Mama	Proteína	Expresión relacionada con la malignidad del tumor	Akiri et al., 2003
	RNA	Elevados niveles de <i>Lox/2</i> están asociados a baja supervivencia en tumores N0	Peinado et al., 2008
	Proteína	Localización citoplasmática en las células del tumor	Hollosi et al., 2009
	RNA y proteína	Niveles elevados en el estroma tumoral <i>versus</i> estroma normal	Barry-Hamilton et al., 2010
	Proteína	Co-expresión con RAMP3 en tejido tumoral <i>versus</i> tejido normal	Brekman et al., 2011
	RNA	Asociada con la progresión tumoral de tumores de mama ER ⁻	Barker et al., 2011
	RNA y proteína	Sobreexpresión y patrón perinuclear asociado con la metástasis de carcinomas basales de mama	Moreno-Bueno et al., 2011
Colon	Proteína	Sobreexpresión relacionada con la progresión tumoral	Fong et al., 2007
	RNA/proteína	Co-expresión con TIMP-1 y RAMP3 en el tejido tumoral	Offenberg et al., 2008 y Brekman et al., 2011
	RNA	Sobreexpresión asociada con ausencia de invasión linfocascular	Kim et al., 2009
	RNA y proteína	Niveles elevados en el estroma tumoral <i>versus</i> estroma normal	Barry-Hamilton et al., 2010
Gástrico	Proteína	La sobreexpresión correlaciona con invasión, metástasis a nódulos linfáticos y menor supervivencia	Peng et al., 2009
	Proteína	Sobreexpresión asociada a progresión tumoral de carcinomas de esófago	Fong et al., 2007
	Proteína	Co-expresión con RAMP3 en tejido tumoral <i>versus</i> tejido normal	Brekman et al., 2011
Cabeza y cuello	RNA	Reducción de la expresión en muestras tumorales	Rost et al., 2003
	RNA y proteína	Sobreexpresión y patrón perinuclear asociado con mal pronóstico en SCC de laringe	Peinado et al., 2008
	RNA y proteína	Niveles elevados en el estroma tumoral <i>versus</i> estroma normal	Barry-Hamilton et al., 2010
Pulmón	RNA	Sobreexpresión relacionada con baja supervivencia en SCC	Peinado et al., 2008
	RNA y proteína	Bajos niveles correlacionan con adenocarcinomas más indiferenciados	Zhan et al., 2011

4.3.1. LOXL2 en la diferenciación tumoral.

Estudios de nuestro laboratorio indentificaron a LOXL2 como un marcador de mal pronóstico en SCC de laringe (LSCC) y pulmón (Peinado et al., 2008). El análisis por inmunohistoquímica (IHQ) en muestras tumorales de LSCC reveló que LOXL2 se expresaba intracelularmente con dos patrones diferentes. Uno más difuso y débil y otro más intenso y heterogéneo con una tinción citoplasmática y perinuclear. Este último, correlacionaba significativamente con tumores menos diferenciados, recurrencia local y baja supervivencia. Adicionalmente, se detectó una asociación inversa entre los niveles de expresión de *LOXL2* y la supervivencia en pacientes con SCC de pulmón y carcinomas de mama N0 (Peinado et al., 2008). El silenciamiento de *LOXL2* en la línea celular HaCa4, procedente de un SCC de piel de ratón, mostró una reducción del comportamiento invasivo y exhibió un programa de diferenciación similar al que se produce en la epidermis. Además, los niveles de caherina-E aumentaron, con independencia del factor de transcripción Snail1 (Peinado et al., 2008).

La expresión citoplasmática de LOXL2 también está asociada con metástasis a nódulos linfáticos en SCC de esófago (Li et al., 2012). Contrariamente, otros trabajos señalaron que la expresión de *LOXL2*, y también *LOX*, estaba reducida en SCC de cabeza y cuello (Rost et al., 2003).

4.3.2. LOXL2 y TEM en cáncer.

Trabajos previos de nuestro laboratorio indicaron que la TEM ocurría principalmente en cáncer de mama de tipo basal (Sarrio et al., 2008). La clasificación molecular de los tumores de mama incluye: el tipo luminal, caracterizado por la expresión de marcadores luminales y receptores de estrógenos (ESR) y/o progesterona (PR); el tipo ErbB2neu, que sobreexpresa el oncogén *neu*; el tipo normal-*like*, que tiene unas características similares al tejido normal; y el tipo basal, caracterizado por la expresión de marcadores mioepiteliales (como citoqueratina 5/6, EGFR y p63) y por la ausencia de ESR, PR y ErbB2neu (triples negativos) (Perou et al., 2000). Así, el estudio de la expresión de LOXL2 en muestras tumorales de mama mostró que el patrón citoplasmático intenso y heterogéneo se asociaba con metástasis distal en carcinomas basales de mama (Moreno-Bueno et al., 2011). Líneas celulares derivadas de este tipo de carcinomas expresan altos niveles de LOXL2 intracelular y su silenciamiento afecta negativamente a sus capacidades migratorias, invasivas y metastáticas (Moreno-Bueno et al., 2011). La sobreexpresión de LOXL2 promueve la migración celular en otras líneas de cáncer de mama como las células MCF7 (Hollosi et al., 2009). Nuestro grupo demostró que LOXL2 regulaba la plasticidad epitelial de estas células de un modo independiente de Snail1 (Moreno-

Bueno et al., 2011), implicando la represión transcripcional de genes relacionados con la polaridad apico-basal, como *claudina-1* y *LGL2* (Figura 6) (Moreno-Bueno et al., 2011). Para ello, se precisaría de la unión indirecta de LOXL2 a los promotores de estos genes, sugiriendo que otras proteínas mediadoras son necesarias (Cuevas et al., 2014). Además, se le confirió un papel activo en la modulación de las adhesiones focales mediante la activación de la vía de señalización de FAK/Src (Figura 6) (Moreno-Bueno et al., 2011). Sorprendentemente, estudios realizados en células MDCK y en líneas de cáncer de mama muestran que el control transcripcional que ejerce LOXL2 sobre *cadherina-E*, *claudina-1* y *LGL2*, y sobre la activación de la vía FAK/Src durante la TEM es independiente de la actividad catalítica del enzima (Cuevas et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011). Estos datos contrastan con estudios llevados a cabo en células de cáncinomas gástricos, donde LOXL2 extracelular activa la vía FAK/Src gracias al peróxido de hidrógeno producido durante la catálisis (Peng et al., 2009).

Se ha descrito que la actividad protumorigénica de LOXL2 y su participación en la TEM en algunas líneas celulares de cáncer de mama también podrían estar parcialmente mediadas por la proteína modificadora de la actividad del receptor 3 (RAMP3) (Brekman et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos por los cuales LOXL2 activa a RAMP3 y su posterior promoción de TEM e invasión son completamente desconocidos (Figura 6).

4.3.3. LOXL2 y matriz extracelular en procesos tumorales.

Trabajos de otros grupos también han sugerido la contribución de LOXL2 a la metástasis de tumores de mama a través de la remodelación de la MEC (Akiri et al., 2003; Barker et al., 2011; Barker et al., 2013; Barry-Hamilton et al., 2010). LOXL2 regula positivamente la expresión de TIMP-1 y MMP9 cuya actividad es necesaria para mantener el comportamiento invasivo de las células (Figura 6) (Barker et al., 2011). Además, la actividad catalítica de LOXL2 podría favorecer la activación de los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) (Barker et al., 2013; Barry-Hamilton et al., 2010). Barry-Hamilton et al. propusieron que el posible aumento de la tensión mecánica mediada por LOXL2 induce la activación del TGF- β 1 latente en el estroma, siendo éste el mecanismo responsable directo de la activación de los CAFs (Figura 6). Numerosos estudios han demostrado que la activación de estas células facilita la remodelación la MEC potenciando así la señalización de múltiples vías patogénicas (Butcher et al., 2009; Levental et al., 2009). La inhibición alostérica de LOXL2 mediante anticuerpos específicos disminuye los niveles de TGF- β 1 y de otros factores de crecimiento, disminuyendo la angiogénesis y la carga metastática en modelos de xenograft (Barry-Hamilton et al., 2010; Zaffryar-Eilott et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado la participación de LOXL2, y

también de otros miembros de la familia, en la remodelación directa de la MEC de los sitios pre-metastásicos, favoreciendo la llegada de distintos tipos celulares implicados en este proceso (Canesin et al., 2014; Erler et al., 2009; Wong et al., 2011). Además, estudios recientes de nuestro grupo han mostrado la colaboración de Loxl2 con E47 en la formación del nicho pre-metastásico (Canesin et al., 2014).

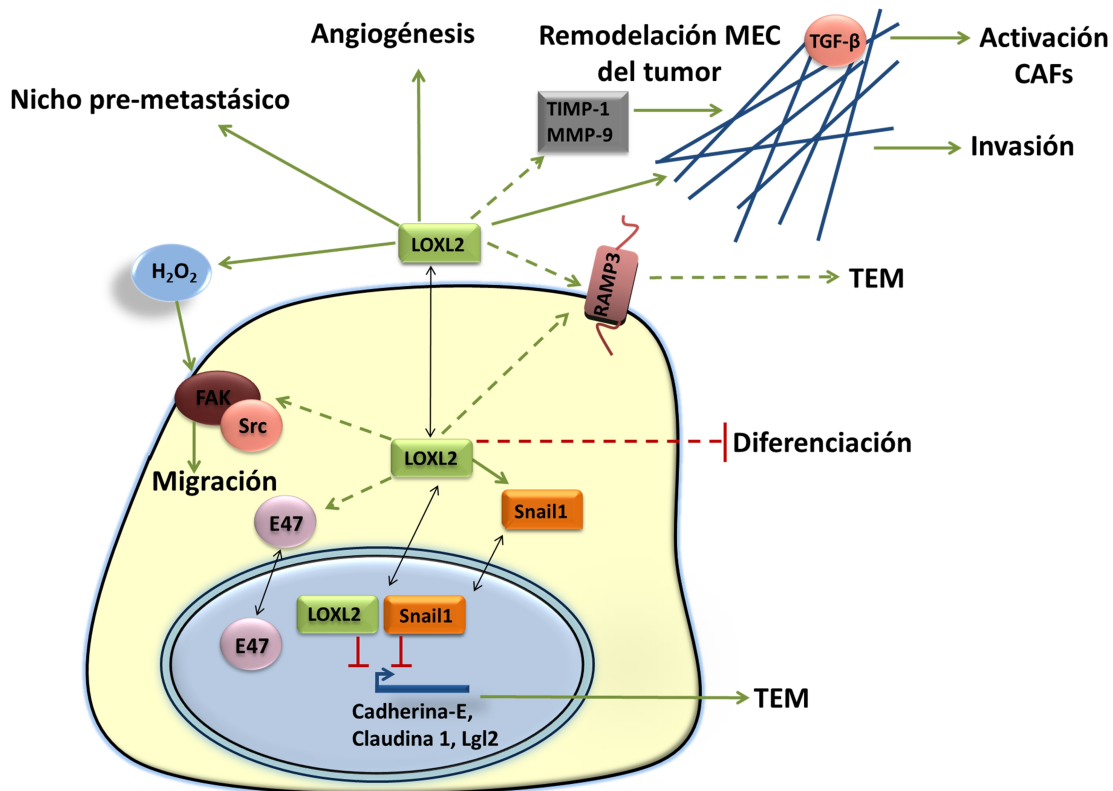


Figura 6. Funciones intra y extracelulares de LOXL2 en diferentes procesos relacionados con el cáncer. LOXL2 puede participar en la remodelación de la MEC del tumor, la diferenciación, la TEM (mediante el control transcripcional de genes relacionados con adhesión celular y polaridad apico-basal), la activación de vías dependientes de quinasas de adhesión focal (FAK/Src), la angiogénesis y el nicho pre-metastásico, mediante procesos dependientes e independientes de Snail1 y E47. Las líneas discontinuas representan mecanismos activadores o inhibidores todavía no esclarecidos.

5. EL NICHOS PRE-METASTÁTICO.

5.1. Concepto de nicho pre-metastático y factores implicados.

La metástasis es un proceso altamente ineficiente, ya que sólo unas pocas células del tumor primario pueden llegar a colonizar un órgano distante. En el pasado, se pensaba que la metástasis estaba limitada únicamente por los factores mecánicos causados por la estructura de los vasos sanguíneos (Onuigbo, 1962). Sin embargo, las células tumorales tienen que superar sucesivos cuellos de botella hasta poder diseminarse en un tejido secundario. Se cree que los tumores más agresivos son capaces de liberar a la circulación sanguínea miles de células tumorales cada día, conocidas actualmente como CTCs (*circulating tumor cells*)

(Nagrath et al., 2007). De éstas, sólo algunas son capaces de extravasarse y anidar en un órgano distante (micrometástasis), y muy pocas pueden llegar a expandirse y colonizar hasta formar una lesión secundaria clínicamente detectable (macrometástasis) (Valastyan and Weinberg, 2011). Además, en los tumores sólidos, los órganos diana de la metástasis de un tipo de cáncer pueden ser completamente diferentes al de otros tipos, sugiriendo que existe un tropismo hacia determinados tejidos (Horak and Steeg, 2005). Todas estas evidencias llevaron a pensar sobre la necesidad de un microentorno receptivo en el órgano diana para que las células tumorales pudieran anidar y formar metástasis. Esta idea ya fue inicialmente sugerida por Steven Paget en el siglo XIX (Paget, 1889), postulando la teoría del “*seed and soil*”, que concluyó que el microambiente local de un determinado tejido debía ser más permisivo que el de otros para que las células tumorales diseminadas pudieran llegar a él y colonizarlo. Hoy en día, ese microentorno es conocido como nicho pre-metastásico. Numerosos factores secretados por el tumor primario condicionan a ciertos tejidos a crear un ambiente adecuado para la recepción de las células cancerígenas (Psaila and Lyden, 2009). Estos factores solubles permiten atraer a células derivadas de la médula ósea (BMDCs: *Bone Marrow Derived Cells*) que suelen estar asociadas al tumor, como células progenitoras hematopoyéticas y macrófagos, que facilitan a su vez la adhesión e invasión de células tumorales (Hiratsuka et al., 2006; Kaplan et al., 2005). Los distintos patrones de diseminación metastásica entre diferentes clases de tumores podrían explicarse porque los factores secretados por el tumor primario favorecen la formación del nicho pre-metastásico en un determinado tejido. Además, se piensa que dentro de un órgano específico hay zonas que son más propensas para la anidación de las células del tumor, como por ejemplo las zonas cercanas a los bronquiolos terminales del pulmón (Kaplan et al., 2005).

Kaplan et al. observaron que células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea (HPCs: *Hematopoietic Progenitor Cells*) estaban presentes en los sitios pre-metastásicos antes de la llegada de las primeras células tumorales. Estas células son positivas para los marcadores de precursores hematopoyéticos inmaduros KIT, SCA1, CD11b y para los receptores VEGFR1 y VLA4 (integrina $\alpha 4\beta 1$, receptor de fibronectina) (Kaplan et al., 2005). Previamente, las HPCs habían sido descritas como estimuladoras de la angiogénesis y del crecimiento tumoral (Lyden et al., 2001). Así, la secreción por parte del tumor primario de VEGFA y PlGF (otro miembro de la familia VEGF) estimulaba y movilizaba a las HPCs desde la médula ósea (Figura 7). En las inmediaciones del futuro nicho metastásico se observó un incremento de la expresión de fibronectina, posiblemente producida por fibroblastos estromales en respuesta a factores del tumor primario, que permitiría la adhesión de las HPCs gracias al receptor VLA4. Las HPCs

secretan factores, quimioquinas y enzimas remodeladoras de la MEC, como algunas metaloproteasas (MMPs), que modifican el microambiente local y atraen a su vez a otras células inflamatorias que favorecen la llegada de las células tumorales (Figura 7) (Kaplan et al., 2005; Kaplan et al., 2006). Posteriormente, Hiratsuka et al. demostraron que el tumor primario secreta factores como VEGFA, TGF β y TNF α que inducen la expresión de las proteínas inflamatorias S100A8 y S100A9 en el parénquima pulmonar. Éstas a su vez facilitan la infiltración de células mieloides CD11b+, macrófagos y de las propias células tumorales (Figura 7) (Hiratsuka et al., 2006). Por otra parte, las células mieloides también secretan S100A8 y S100A9 estimulándose de manera autocrina para reclutar BMDCs y potenciar la metástasis (Hiratsuka et al., 2008). Además, las células precursoras mieloides producen IL-1, IL-6 y TNF α facilitando la metástasis al incrementar la permeabilidad vascular, la proliferación de células tumorales y el reclutamiento de nuevas células mieloides. La relación entre los linajes de células HPCs y mieloides no está totalmente esclarecida y se piensa que estas dos subpoblaciones pueden estar algo solapadas entre sí, postulándose que las células VEGFR1+ sean las primeras en ser reclutadas y produzcan los factores necesarios para el posterior reclutamiento y estimulación de otras poblaciones mieloides (Psaila and Lyden, 2009).

Recientemente, numerosos trabajos también han implicado a las células supresoras mieloides (MDSCs: *Myeloid-derived supresor cells*), otro tipo de BMDCs, en la formación del nicho pre-metastásico dada su función inmunosupresora y antiinflamatoria (Gao et al., 2012; Kowanetz et al., 2010; Sceneay et al., 2012; Yan et al., 2010; Ye et al., 2010). Las MDSCs engloban una población heterogénea de células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras (IMCs). En individuos sanos estas poblaciones se generan en la médula ósea y se diferencian rápidamente en granulocitos, macrófagos o células dendríticas. Sin embargo, en situaciones patológicas, como cáncer y algunas enfermedades infecciosas o autoinmunes, hay un bloqueo parcial en la diferenciación a células mieloides maduras provocando una expansión de estos precursores. Se ha estimado que en la médula ósea de un ratón sano hay un 20-30% de MDSCs que coexpresan en la superficie los antígenos del linaje mieloides GR1 y CD11b (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). La expansión de las MDSCs está inducida por varios factores secretados por el tumor primario como cicloxigenasa 2, prostaglandinas (Sinha et al., 2007), factor de células *stem* (SCF) (Pan et al., 2008), IL-6 (Bunt et al., 2007), VEGF (Gabrilovich et al., 1998) o el factor de estimulación de colonias de granulocitos o macrófagos (GM-CSF) (Serafini et al., 2004). La mayoría de ellos estimulan la producción de MDSCs e inhiben su diferenciación a células mieloides maduras (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Las proteínas S100A8 y S100A9, que también son producidas por el tumor primario, promueven la migración y expansión de

estas células al unirse a receptores de su superficie (Sinha et al., 2008). Los mecanismos inmunosupresores de las MDSCs activas implican la participación de diversas moléculas producidas directa (ARG1, iNOS) o indirectamente de forma autocrina que en última instancia inhiben la función de células del sistema inmune, principalmente de células T (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Spano and Zollo, 2012).

La formación de macrometástasis requiere el ensamblaje de una vasculatura funcional para lo que son necesarias las células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea (EPCs: *Endothelial Progenitor Cells*) (Peinado et al., 2011). Adicionalmente, los macrófagos asociados al tumor (TAMs: *Tumor Associated Macrophages*) también potencian la angiogénesis gracias a la expresión de VEGFA y angiopoyetinas (Figura 7) (Pollard, 2004).

5.2. Papel de las proteínas LOX en la formación del nicho pre-metastásico.

En los últimos años, la participación de varios miembros de la familia LOX en el nicho pre-metastásico se ha hecho cada vez más evidente a partir de estudios en modelos *xenograft*. LOX es secretada por tumores hipóxicos y se acumula junto a fibronectina en los futuros sitios de la metástasis (Figura 7). De esta manera, remodela el colágeno IV en la membrana basal del parénquima pulmonar y facilita la adhesión de células precursoras mieloides CD11b+ (Erler et al., 2009). Las BMDCs reclutadas producen MMP-2, que degrada el colágeno IV favoreciendo la adhesión de precursores mieloides adicionales y liberando péptidos de colágeno que tienen funciones quimioatrayentes. Este proceso provoca un mecanismo de retroalimentación positiva que ayuda a crear un ambiente favorable para la formación del nicho pre-metastásico (Erler et al., 2009). Recientemente, se ha descrito un mecanismo similar para otros miembros de la familia LOX (LOXL1, LOXL2, LOXL4) a través del factor HIF-1 α (Wong et al., 2011). LOX también ha sido implicada en la estimulación de la proliferación y la colonización metastásica a través de la fibrosis causada por la remodelación del colágeno I en los órganos diana (Cox et al., 2013). Por otra parte, nuestro grupo ha descrito recientemente la participación de Loxl2 y E47 en la formación del nicho pre-metastásico modulando la expresión de varias citoquinas en modelos *xenografts* (Canesin et al., 2014).

A pesar de estos antecedentes, la contribución individual de cada uno de los miembros LOX-like en la formación del nicho pre-metastásico *in vivo* apenas ha sido estudiada. Además, se desconoce si algunas proteínas de la familia lisil oxidasa podrían favorecer la formación del nicho pre-metastásico, en modelos fisiológicos, mediante mecanismos independientes a la remodelación de la MEC.

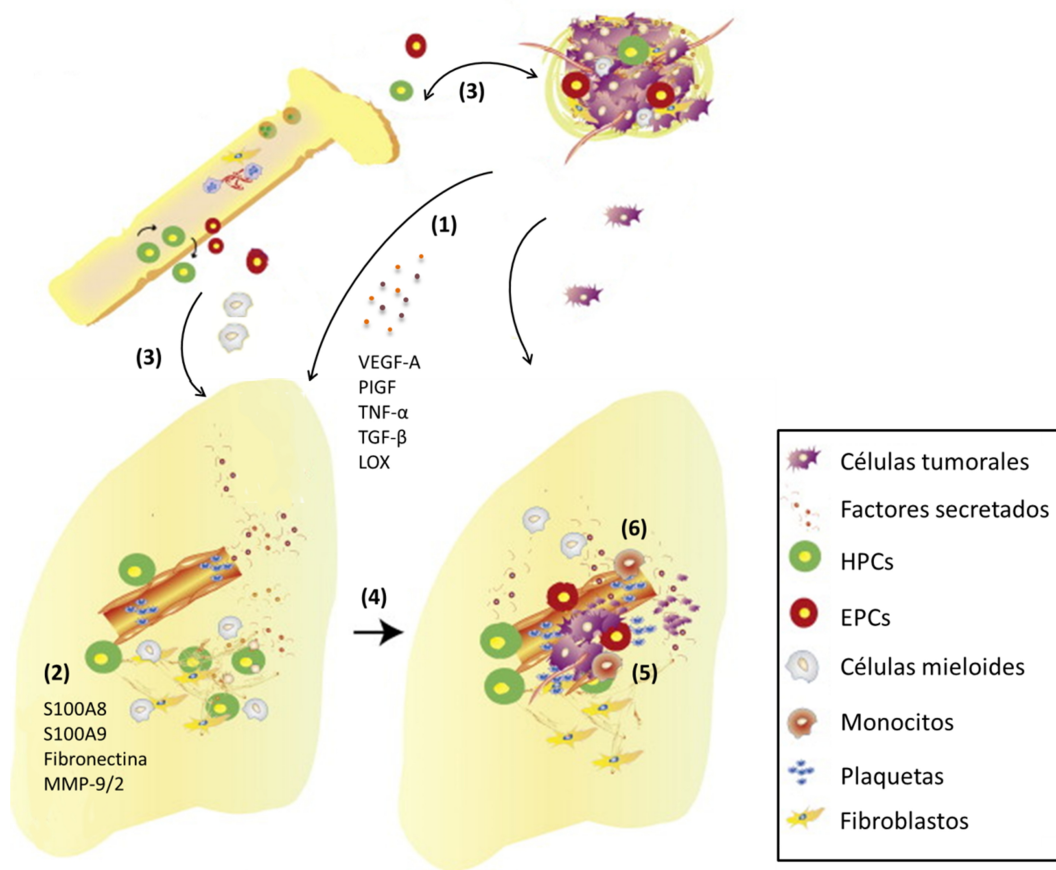


Figura 7. Representación esquemática de la evolución del nicho pre-metastásico. En respuesta a factores de crecimiento secretados por el tumor primario (TNF- α , TGF- β , VEGF-A, PlGF, LOX, entre otros) (1), se induce la sobreexpresión de quimioquinas y otros factores en el pulmón (S100A8, S100A9, Fibronectina, MMP2, MMP9) (2), que conjuntamente inducen la movilización y el reclutamiento de poblaciones específicas de BMDC, como las células precursora hematopoyéticas (HPCs) y las células de linaje mieloide al tumor primario y al pulmón (3). Estas células, junto con los factores secretados por el tumor primario y en el pulmón, inducen la remodelación de la MEC del pulmón (4). Los fibroblastos y las plaquetas también contribuyen a la formación del nicho premetastásico (5). Las células metastásicas empiezan a colonizar el pulmón y se activa la expresión de proteínas que favorecen el crecimiento de las metástasis. El reclutamiento de células progenitoras del endotelio (EPCs) y de monocitos favorece la creación de un entorno pro-angiogénico y la progresión de micrometástasis a macrometástasis (6). Adaptado de Peinado et al., 2011.

Objetivos

Durante la última década, el número de estudios que relacionan a LOXL2 con cáncer se ha incrementado significativamente. Trabajos previos de nuestro laboratorio asignaron a la proteína un papel funcional durante la TEM y la metástasis. Sin embargo, la ausencia de modelos animales transgénicos para *Loxl2* impide valorar con precisión el papel que juega en la progresión tumoral, así como su consideración como posible diana terapéutica. En base a estos antecedentes, al inicio de esta Tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Generación de un modelo de ratón transgénico condicional de sobreexpresión de *Loxl2*.**
- 2. Caracterización funcional del efecto de la delección y sobreexpresión constitutiva de *Loxl2* en la fisiología animal.**
- 3. Estudio del papel de *Loxl2* en la carcinogénesis de piel de ratón.**
- 4. Estudio de la función de *Loxl2* en la progresión de tumores de mama y su implicación en la formación del nicho pre-metastásico.**

Materiales y métodos

1. PLÁSMIDOS.

1.1 Vector de recombinación homóloga de sobreexpresión de *Lox12*.

El vector de recombinación homóloga (vector de “*targeting*”) para la sobreexpresión de *Lox12* se generó siguiendo la tecnología Gateway® de clonación de DNA (Nyabi et al., 2009). Para ello, se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente (RT) 100 ng del plásmido pEntry, que llevaba la secuencia completa del cDNA de *Lox12* de ratón (previamente generado en nuestro laboratorio), y 150 ng del vector de destino pROSA-DV (cedido por el Dr. Jody Haigh; Australian Centre for Blood Diseases, Melbourne, Australia) con la mezcla de *LR Clonase II* (Invitrogen). El vector de destino pROSA-DV contenía dos regiones del locus *Rosa26* (*R26*), a modo de brazos de homología 5' y 3', flanqueando una secuencia aceptora de *splicing* (*SA*), el *cassette PGK-neoSTOP*, el sitio de clonaje del cDNA de *Lox12* (*ccdB*) y el gen reportero *GFP* precedido por una secuencia *IRES* (Figura 8). Después de la recombinación *in vitro*, la mezcla de la reacción fue electroporada en la cepa bacteriana DH5α. Estas bacterias se incubaron a 28°C en 300 µl de medio LB sin antibióticos durante 90 min en agitación. Posteriormente fueron sembradas en placas de agar con LB-Ampicilina, donde crecieron también a 28°C. La expansión bacteriana para la extracción de DNA mediante *miniprep* y *midiprep* (Promega) fue también llevada a cabo a 28°C para evitar recombinaciones no deseadas. Alrededor de 10 colonias fueron sometidas a digestión por enzimas de restricción para identificar los clones portadores de la construcción recombinante. Los clones correctos, en los que *Lox12* se había insertado en el vector pROSA-DV, fueron secuenciados usando los oligonucleótidos *S1for* (ATCATGTCTGGATCCCCATC) y *S2rev* (GGGGCGGAATTCGATATCAAG). El vector resultante fue utilizado para la recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón (ESCs) que se usaron para generar el ratón de sobreexpresión de *Lox12*.

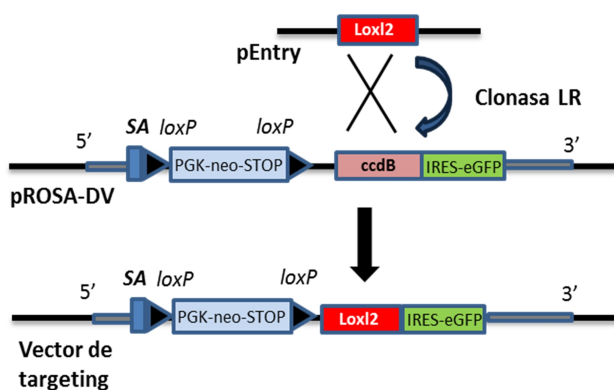


Figura 8. Generación del vector de *targeting* para la sobreexpresión de *Lox12*. El vector pEntry contenía la secuencia del cDNA de *Lox12* de ratón. El plásmido de destino pROSA-DV contenía dos regiones del locus *Rosa26* (*R26*), a modo de brazos de recombinación homóloga 5' y 3', flanqueando la secuencia aceptora de *splicing* (*SA*), el *cassette PGK-neoSTOP*, (flanqueado a su vez por dos sitios *loxP*), el sitio de clonaje del cDNA de *Lox12* (*ccdB*) y el gen reportero *GFP*. Ambos plásmidos se incubaron con la mezcla de reacción *LR Clonase II* que permitió la clonación del cDNA de *Lox12* por recombinación *in vitro* en el plásmido destino obteniéndose el vector de *targeting* o vector de recombinación homóloga.

1.2. Vectores virales.

El vector lentiviral *GFP-Luciferasa* (*GFP-Luc*), que albergaba las secuencias de cDNA del gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP y del gen reportero luciferasa, así como los vectores adenovirales *Adeno-GFP* y *Adeno-Cre* fueron generados y cedidos por el laboratorio del Dr. Mariano Barbacid, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, España).

2. MODELOS DE RATÓN.

Todos los estudios con ratones fueron llevados a cabo en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de ética para la experimentación animal de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI-25-587). Los animales utilizados, a excepción de los ratones desnudos, tenían un fondo genético 50% FVB. El otro 50% resultó ser una mezcla de diferentes cepas de ratón que incluyen CD1, C57BL/6 y 129Sv.

2.1. Generación del modelo genético de ratón knock-out (KO) condicional y constitutivo del gen *Lox12*.

La construcción recombinante para la generación del modelo de ratón *Lox12* KO fue encargada a *Gene Bridges Company* (Heidelberg, Alemania). Este vector contenía el exón 2 de *Lox12* de ratón (portador del sitio de inicio de la traducción) y el *cassette PGK-neo* (resistencia a neomicina), flanqueados por sitios *loxP* y *frt*, respectivamente, junto con sendas regiones del locus de *Lox12* en los extremos 5' y 3' (brazos de homología) (Figura 9A). La construcción fue electroporada en ESCs de la cepa híbrida C57BL/6 y 129Sv (en la Unidad de Transgénesis del CNIO) incorporándose mediante recombinación homóloga en el locus endógeno de *Lox12* (alelo condicional *flneo*) (Figura 9A). Los clones positivos, resistentes a neomicina, fueron verificados mediante PCR diagnóstica (Figura 9B y Tabla 2). Dos de esos clones fueron agregados en mórulas de ratones CD1 (Unidad de Transgénesis del CNIO) para la generación de animales quiméricos y aquellos capaces de transmitir el alelo recombinante se utilizaron como fundadores de la colonia transgénica condicional. Para los experimentos llevados a cabo en este trabajo se utilizaron los animales procedentes de uno de los dos clones agregados.

Los animales con el alelo *flneo* en heterocigosis ($L2^{+/flneo}$) fueron cruzados con la cepa portadora de la recombinasa flipasa (*Flp*) y posteriormente con la línea *CMV-Cre* (ambas cedidas por el CNIO), que expresa ubicuamente la recombinasa Cre (Schwenk et al., 1995)

(Figura 9A). De este modo, el exón dos de *Lox12* quedó deletado, imposibilitando así la expresión del gen. El cruce de animales heterocigotos ($L2^{+/-}$) permitió generar la línea KO constitutiva para *Lox12* ($L2^{-/-}$). El análisis mediante PCR semicuantitativa y de extractos proteicos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*) confirmó la eliminación de *Lox12* en los animales $L2^{-/-}$ (Figura 9C y D).

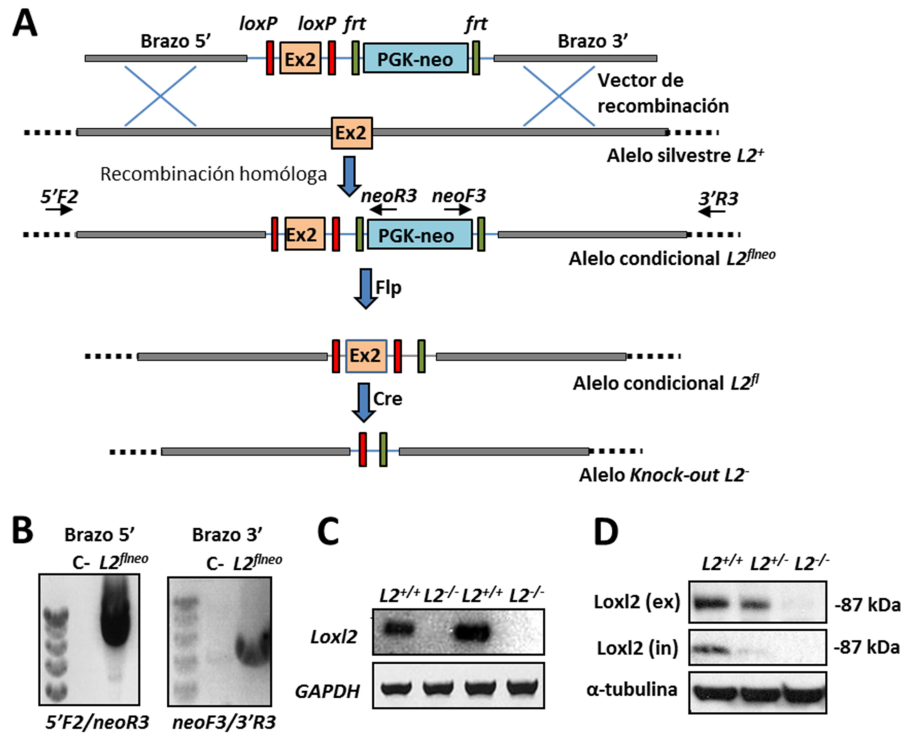


Figura 9. Generación del ratón KO de *Lox12*. (A) Representación esquemática de los diferentes alelos de *Lox12*. El exón 2 (Ex2, naranja) y la caja *PGK-neo* de resistencia a neomicina (azul), flanqueados por sitios *loxP* (rectángulos rojos) y *frt* (rectángulos verdes), respectivamente, están indicados en el vector de recombinación. La recombinação homóloga resultó en la generación del alelo $L2^{fneo}$. Los alelos $L2^{fl}$ y $L2^{-}$ fueron obtenidos tras la acción de las recombinasas Flp (flipasa) y Cre, respectivamente. Se indican también los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR tanto del brazo 5' (5'F2/neoR3) como del 3' (neoF3/3'R3). (B) Análisis por PCR diagnóstica de los clones positivos de células ES. En paralelo se usó un control negativo (C-). (C) Análisis por PCR semicuantitativa del RNA procedente de MEFs de los genotipos indicados. Se usó *GAPDH* como control de carga. (D) Análisis de *Lox12* por WB de extractos celulares totales (in) y del medio condicionado (ex). α -tubulina fue utilizada como control de carga.

2.2. Generación del modelo genético de ratón con sobreexpresión condicional y constitutiva del gen *Lox12*.

Una descripción detallada de la generación del modelo de ratón de sobreexpresión de *Lox12* puede encontrarse en el apartado 1 de Resultados. Brevemente, el vector de recombinación homóloga (apartado 1.1 de Materiales y Métodos) se electroporó en ESCs de la cepa híbrida C57BL/6 y 129Sv (en la Unidad de Transgénesis del CNIO) incorporándose en el locus *R26* (Figura 10). Los clones de ESCs positivos se agregaron en mórulas procedentes de ratones de la cepa CD1 (CNIO) obteniendo animales quiméricos y finalmente ratones condicionales de sobreexpresión de *Lox12* ($R26^{+/STOPL2}$). Para obtener animales de

sobreexpresión constitutiva, los ratones condicionales $R26^{+/STOPL2}$ se cruzaron con la cepa $CMV-Cre$, generándose así los animales de sobreexpresión constitutiva de $Lox12$ (Figura 10).

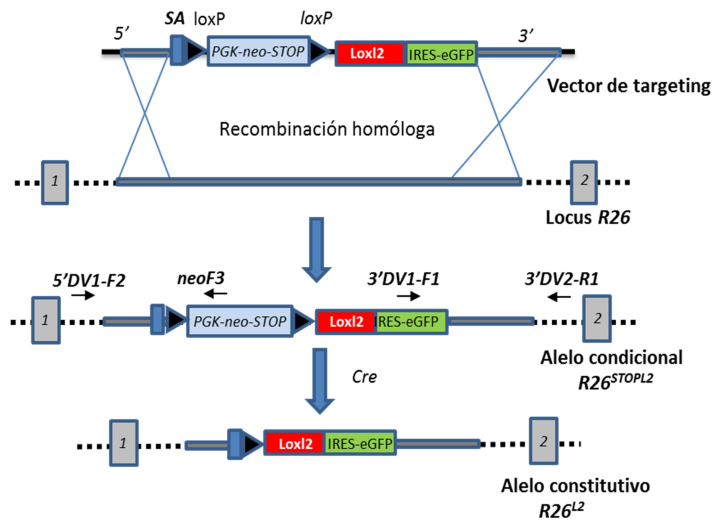


Figura 10. Generación del ratón de sobreexpresión de $Lox12$. Esquema de los diferentes alelos $R26$. El vector de vector de *targeting* contiene una señal aceptora de *splicing* (SA), una caja *PGK-neo-STOP* (resistencia a neomicina y señal de terminación transcripcional) (azul), flanqueada por sitios *loxP* (triángulos negros), y la secuencia del cDNA de *Lox12* (rojo), seguido del gen reportero *GFP* precedido de una secuencia *IRES* (verde). El alelo $R26^{STOPL2}$ se generó por recombinação homóloga. Después de la escisión mediada por Cre, la caja *PGK-neo-STOP* es eliminada y el tándem *Lox12/GFP* es expresado bajo el promotor $R26$ ($R26^{L2}$). Se muestran también los oligonucleótidos usados en las PCRs diagnósticas.

2.3. Modelo tumoral de mama *PyMT* con delección y sobreexpresión condicional del gen *Lox12*.

Para poder estudiar la función de *Lox12* en la tumorigénesis mamaria fueron utilizadas las líneas transgénicas *MMTV-Cre* (cedida por la Unidad de Transgénesis del CNIO) y *MMTV-PyMT* (Jackson Laboratories). Los animales del modelo *PyMT* que albergaban la delección ($PyMT; L2^{\Delta/-}$) (Figura 11A) o sobreexpresión condicional de *Lox12* ($PyMT; R26^{L2}$) (Figura 11B) en la glándula mamaria fueron generados al cruzar hembras $L2^{fl/fl}$ o $R26^{STOPL2/STOPL2}$ con machos $PyMT^{+/T}; MMTV-Cre^{+/T}; L2^{fl/-}$ y $PyMT^{+/T}; MMTV-Cre^{+/T}; R26^{STOPL2/STOPL2}$, respectivamente. Hermanos de camada $PyMT^{+/T}; MMTV-Cre^{+/+} L2^{fl/fl}$ ($PyMT; L2^{fl/fl}$) y $PyMT^{+/T}; MMTV-Cre^{+/+}; R26^{STOPL2/STOPL2}$ ($PyMT; L2^{STOPL2}$) se utilizaron como controles para cada uno de los dos grupos (Figura 11 A y B).

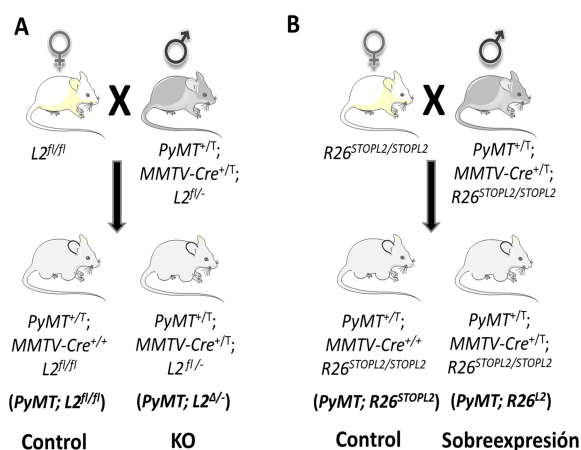


Figura 11. Esquema de los cruces de ratones que generaron los modelos tumorales *PyMT* de delección y sobreexpresión condicional de *Lox12*. (A) Modelo de delección de *Lox12*. Machos transgénicos para el oncogén *PyMT* y la recombinasa Cre, y con el alelo condicional *L2* en heterocigosis (el otro alelo se encontraba ya deletado) se cruzaron con hembras condicionales $L2^{fl/fl}$ para generar los modelos tumorales control y KO para *Lox12* en la glándula mamaria. (B) Modelo de sobreexpresión de *Lox12*. Machos transgénicos para el oncogén *PyMT* y la recombinasa Cre, condicionales $R26^{STOPL2/STOPL2}$, se cruzaron con hembras condicionales $R26^{STOPL2/STOPL2}$ para generar los modelos tumorales controles y de sobreexpresión de *Lox12* en la mama. Datos adicionales de estos modelos también se presentan en el apartado 6 de resultados.

2.4. Ratones inmunodeprimidos.

Los ensayos de inyección de células tumorales en cola y glándula mamaria fueron realizados en ratones inmunodeprimidos (*nu/nu*) Balb/c (Charles River Laboratories).

3. PCR DIAGNÓSTICA Y GENOTIPADO DE RATONES.

3.1 PCR diagnóstica.

Los clones de células ES portadores de los alelos $L2^{flneo}$ o $R26^{STOPL2}$ fueron identificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos internos y externos a los extremos recombinantes 5' y 3' (Tabla 2, Figura 9 y Figura 10). El DNA de las células se extrajo según el protocolo universal de extracción de DNA con sal y precipitación con isopropanol (Aljanabi and Martinez, 1997). Las reacciones se llevaron a cabo usando la enzima *Takara LA Taq hot Start Version* en las siguientes condiciones:

Línea KO de *Lox12* (brazos 5' y 3'):

- 1 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 62°C, 12 min a 68°C) x 35 repeticiones
- 12 min a 72°C

Línea de sobreexpresión de *Lox12* (brazo 5'):

- 1 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 63°C, 2,5 min a 68°C) x 35 repeticiones
- 7 min a 72°C

Línea de sobreexpresión de *Lox12* (brazo 3'):

- 1 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 63°C, 5,5 min a 68°C) x 35 repeticiones
- 7 min a 72°C

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las PCR de diagnóstico para los alelos $L2^{flneo}$ y $R26^{STOPL2}$

ALELO	OLIGONUCLEÓTIDO FW	OLIGONUCLEÓTIDO RW	TAMAÑO AMPLICÓN
Brazo 5' $L2^{flneo}$	gcctatagacatgcaaaccag (5'F2)	agaggctattcggctatgactg (neoR3)	10,5 Kb
Brazo 3' $L2^{flneo}$	ccagtcatagccgaatagcc (neoF3)	ccagcttcctatatgtgtgtc (3'R3)	10,5 Kb
Brazo 5' $R26^{STOPL2}$	taggtaggggatcgggactc (DV2-5'F2)	ccagtcatagccgaatagcc (neoF3)	2 kb
Brazo 3' $R26^{STOPL2}$	gaacggcatcaaggtgaac (DV1-3'F1)	atctcgaagacctgttgctg (DV2-3'R1)	4,5 kb

3.2. PCR de genotipado.

Para el genotipado convencional se extrajo DNA genómico de la cola de ratones de entre 25-30 días de edad según el protocolo universal de extracción de DNA con sal y precipitación con isopropanol (Aljanabi and Martinez, 1997). La presencia de los diferentes alelos se detectó mediante PCR convencional de DNA genómico, a partir de aproximadamente 200 ng de DNA, utilizando los oligonucleótidos indicados en la Figura 12 y cuyas secuencias se recogen en la Tabla 3.

Para las reacciones de PCR se usó el reactivo *Redextract-N-Amp Reaction Mix* (Sigma Aldrich). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Alelos $L2^+$, $L2^{flneo}$, $L2^{fl}$, $L2^-$, $R26^+$, $R26^{STOPL2}$, $R26^{L2}$, *Cre* y *PyMT*:

- 5 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 62°C, 30 seg a 72°C) x 30 repeticiones
- 2 min a 72°C

Alelo *GFP*:

- 5 min a 94°C
- (30 seg a 95°C, 30 seg a 68°C, 30 seg a 72°C) x 30 repeticiones
- 2 min a 72°C.

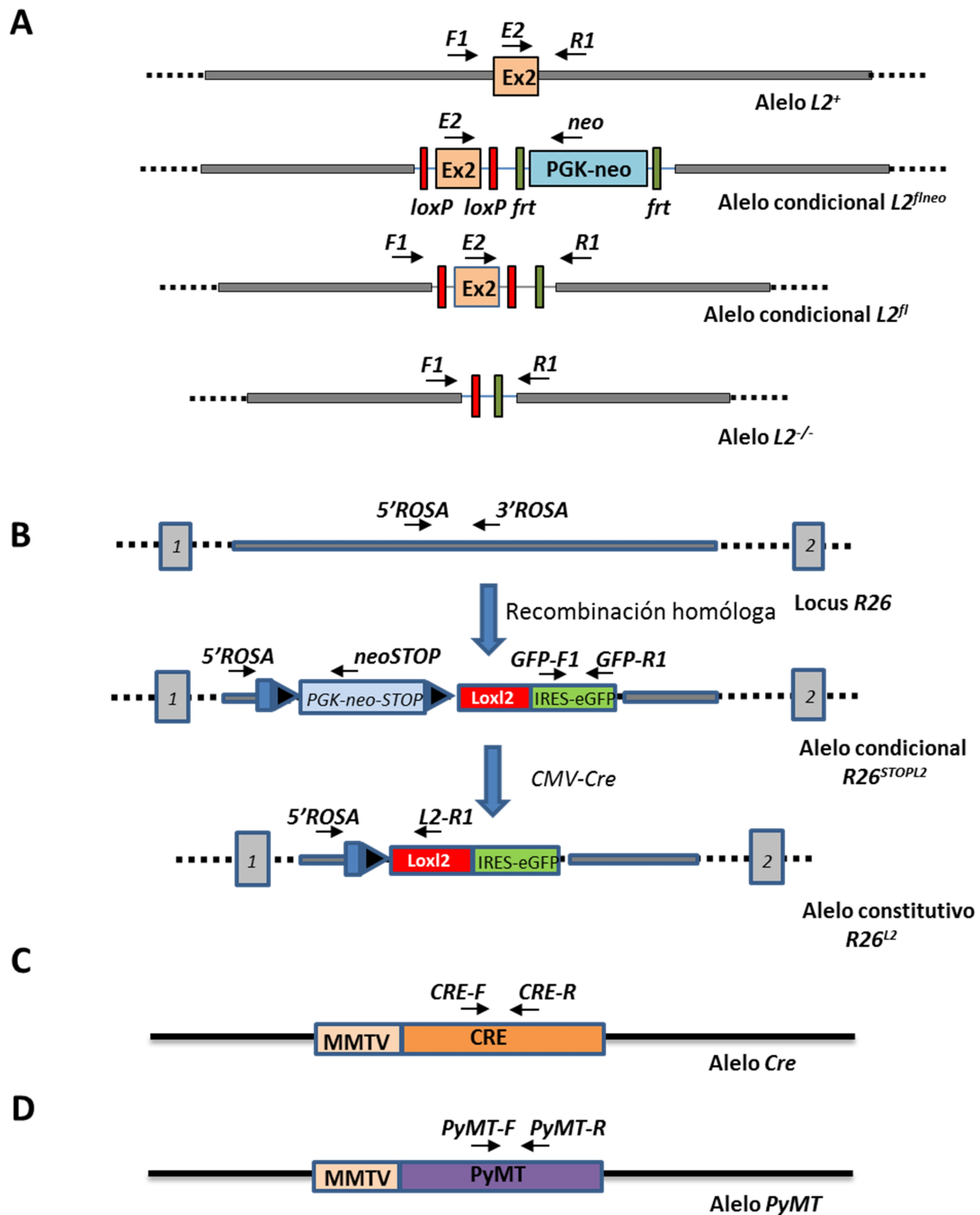


Figura 12. Representación esquemática de los sitios de anillamiento de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de ratones. A) Oligonucleótidos empleados para la detección de los alelos de la línea KO de *Loxl2*: $L2^+$, $L2^{flneo}$, $L2^{fl}$ y $L2^{-}$. **B)** Oligonucleótidos utilizados para la detección de los alelos de la línea de sobreexpresión de *Loxl2*: $R26^+$, $R26^{STOPL2}$ y $R26^{L2}$. **C)** La presencia de la recombinasa *Cre* se detectó usando la pareja de oligonucleótidos *CRE-F* y *CRE-R*. **D)** El gen codificante para el antígeno del PyMT se detectó mediante los oligonucleótidos *PyMT-F* y *PyMT-R*.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el genotipaje de ratones.

ALELO	OLIGONUCLEÓTIDO FW	OLIGONUCLEÓTIDO RW	TAMAÑO AMPLICÓN
$L2^{+}$	tggaggtctactacgaaggc (E2)	gaggtgggcacagactaatc (R1)	430 pb
$L2^{flneo}$	tggaggtctactacgaaggc (E2)	caagcgaaacatcgcatc (neo)	820 pb
$L2^{fl}$	tggaggtctactacgaaggc (E2)	gaggtgggcacagactaatc (R1)	530 pb
$L2^{+}$			875 pb
$L2^{fl}$	atcggaattcagactgctg (F1)	gaggtgggcacagactaatc (R1)	1100 pb
$L2^{-}$			410 pb
$R26^{+}$	tatcagtaaggagctgcagtg (5'ROSA)	acccagatgactacatcctc (3'ROSA)	300 pb
$R26^{STOPL2}$	tatcagtaaggagctgcagtg (5'ROSA)	gctaccctgatattgctgaag (neoSTOP)	1000 pb
$R26^{L2}$	tatcagtaaggagctgcagtg (5'ROSA)	cccactggccttcgtagtagac (L2-R1)	750 pb
GFP	aaggacgacggcaactacaag (GFP-F1)	aggtagtgggtgtcgggcag (GFP-R1)	300 pb
Cre	gcctgcattaccggtcgtatgc (CRE-F)	cagggtgttataagcaatcccc (CRE-R)	430 pb
PyMT	aacggcggagcgaggaactc (PyMT-F)	atcgggctcagcaacacaag (PyMT-R)	240 pb

4. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS CELULARES.

Todas las líneas celulares, MEFs y queratinocitos primarios utilizados en este trabajo fueron cultivados a 37°C en una atmósfera humificada al 5% de CO₂.

4.1. Línea celular HEK293T.

Estas células proceden de tejido renal embrionario humano y están transformadas con el antígeno T grande del virus SV40 (ATCC # CRL-11268TM). Fueron crecidas en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 1µg/ml insulina, 1% penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml fungizona.

4.2. Cultivo primario de MEFs.

Los MEFs fueron aislados de embriones de ratón de 13,5 días de gestación. Tras la resección del hígado y parte de la cabeza (para genotipado), los embriones fueron triturados con la ayuda de tijeras estériles en una campana de cultivos celulares. A continuación, se incubaron durante 10 min con 5ml de tripsina al 0,05% (Gibco) a 37°C en placas de 60mm de diámetro (P60, Falcon). Pasado este tiempo, se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 1µg/ml insulina, 1% penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml fungizona. Los cultivos procedentes de cada embrión se dividieron en dos placas de 100 mm de diámetro (P100, Falcon) para su crecimiento. 2 o 3 días después se congelaron varios viales de la expansión del cultivo.

4.3. Cultivo primario de queratinocitos.

Los queratinocitos primarios de ratón se obtuvieron a partir de la epidermis de ratones recién nacidos, de entre 0 y 2 días. Una vez sacrificados, los neonatos, se lavaron en PBS. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se les amputó la cola y las extremidades, y se hizo una incisión longitudinal con un bisturí a lo largo de todo el dorso del animal. Con la ayuda de unas pinzas estériles se separó la piel del resto del cuerpo y se lavó de nuevo con PBS. Cada una de las pieles obtenidas se estiró y se colocó con la dermis hacia abajo en una placa con tripsina sin EDTA (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron colocadas en P60 y con la ayuda de pinzas estériles se separó la epidermis de la dermis. La epidermis fue transferida a una placa nueva donde se troceó con un bisturí y se traspasó a un tubo de 50 ml (Falcon) conteniendo 10 ml de medio de aislamiento. Este medio de cultivo se compone de MEM (Gibco) suplementado con FBS quelado al 2% (cedido por la Dra. Mirna Pérez-Moreno, CNIO), 1,4 mM CaCl₂, 2,5 µg/ml fungizona y 1% penicilina/streptomicina. A continuación, cada tubo fue sometido a agitación con 50 pulsos cortos en un vórtex a velocidad media (Bio-Rad). La suspensión resultante fue filtrada a través de una malla estéril de teflón (Cell strainer 100 µm, Falcon), eliminándose así los agregados de células cornificadas. El filtrado se centrifugó durante 5 min a 1.200 r.p.m. Los queratinocitos fueron resuspendidos en medio de siembra, compuesto de MEM (Gibco) suplementado con FBS quelado al 4% (cedido por la Dra. Mirna Pérez-Moreno, CNIO), 0,2mM CaCl₂, 2,5 µg/ml fungizona y 1% penicilina/estreptomicina. Seguidamente, los queratinocitos aislados fueron sembrados en placas cubiertas de colágeno IV (BD Biosciences). Al día siguiente, el medio de siembra fue reemplazado por medio CnT07 (CELLnTec Advance Cell Systems).

4.4. Cultivo primario de células epiteliales derivadas de tumores PyMT.

Las células tumorales derivadas del modelo de cáncer de mama *PyMT* fueron obtenidas tras la necropsia de los ratones en condiciones asépticas. En una campana de cultivos celulares, los tumores fueron disgregados con unas tijeras quirúrgicas. A continuación, se incubaron durante 1 h en 10 ml de colagenasa al 0,1% (Roche) a 37°C y se filtraron a través de mallas de teflón de 70 µm (Falcon). Después de centrifugar 5 min a 1.200 r.p.m., las células de cada tumor fueron sembradas en placas P100 con medio HAM's F12 suplementado con 5% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 µg/ml insulina, 1 µg/ml hidrocortisona, 1% penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml fungizona. Se obtuvieron cultivos estables tras realizar entre 3-5 pases seriados utilizando tripsina diluida al 0,0125% (Gibco).

5. TRANSFECCIONES E INFECCIONES LENTIVIRALES Y ADENOVIRALES.

Para la generación de lentivirus se sembraron 3×10^6 células HEK293T en placas P100. Al día siguiente fueron transfectadas con CaCl_2 con 10 µg de los plásmidos de empaquetamiento lentiviral: pLP1 (3,9 µg), pLP2 (2,6 µg) y pLPVsVg (3,3 µg); y con 10 µg del vector lentiviral que contiene el tándem reportero *GFP-Luc*. Los sobrenadantes celulares, que contenían las partículas infecciosas lentivirales, fueron recogidos a las 48-60 h de la transfección y filtrados en membranas de 0,45 µm (Falcon). Las células tumorales *PyMT* en crecimiento exponencial (2×10^6 células en placas P100) fueron infectadas con 5 ml de medio con virus, al que previamente se le había añadido 10 µg/ml polibreno (Sigma). Después de 12 h, se les cambió el sobrenadante viral por 10 ml de medio de cultivo fresco. Las células positivas para GFP, y en consecuencia también para luciferasa, fueron separadas a los 7 días mediante citometría de flujo (Cytomics FC 500MPL, Beckman Coulter). Posteriormente, fueron sujetas a infección con adenovirus que expresaban *GFP* (Adeno-*GFP*, utilizado como control) o la recombinasa Cre (Adeno-*Cre*). Para ello, aproximadamente 3×10^6 células fueron incubadas durante toda la noche con 5 ml de medio que contenía los adenovirus purificados en un ratio de 15 partículas infecciosas por célula. Dos infecciones consecutivas fueron necesarias para una delección completa de *Lox/2* que se verificó a nivel de PCR.

6. ENSAYOS CELULARES *IN VITRO*.

6.1. Diferenciación *in vitro* de queratinocitos primarios.

Los queratinocitos primarios fueron sometidos a diferenciación terminal añadiendo medio de cultivo con una concentración 1,4 mM de CaCl_2 . Para ello, se sembraron previamente

$1,5 \times 10^6$ células en placas P60 recubiertas con colágeno IV (BD Biosciences) que fueron recogidas para la extracción de proteínas a las 0 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h, y 48 h después de la adición del Ca^{2+} . En el caso de las células que se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia, éstas se sembraron sobre placas con cristales de 12 mm de diámetro, previamente recubiertos con una matriz artificial de colágeno (Coating Matrix Kit, Gibco) según las instrucciones del fabricante.

6.2. Curvas de crecimiento e inmortalización celular.

Para los ensayos de crecimiento de MEFs, se plaquearon 5×10^4 células en placas de 6 pocillos (Falcon) y se realizaron contajes a los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11 después de la siembra. La gráfica se obtuvo al relativizar las células contabilizadas en cada punto con respecto a un mismo número inicial de células.

Para los ensayos de inmortalización, los MEFs fueron cultivados y sometidos a pases sucesivos siguiendo el protocolo clásico 3T3 durante aproximadamente dos meses. Cada 3 días las células eran contadas y resembradas (10^6 células) en placas P100 para el siguiente contaje. La curva de inmortalización se obtuvo representando el número acumulado de células en relación a un mismo número de partida.

6.3. Análisis del ciclo celular en MEFs.

Para el análisis del ciclo celular en MEFs, se sembraron 5×10^5 células en placas P100 y se recogieron al día siguiente mediante tripsinización. Tras un lavado con PBS y centrifugación a 1.200 r.p.m., fueron resuspendidas en 300 μl de PBS y fijadas con 700 μl de etanol 100% que se añadió cuidadosamente gota a gota mientras la suspensión se agitaba con suavidad. Las células se resuspendieron finalmente en 500 μl de PBS conteniendo 15 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio y se analizaron las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo (Cytomics FC 500MPL, Beckman Coulter).

6.4. Ensayos de migración celular.

Para los ensayos de migración de MEFs, los cultivos celulares a alta confluencia (90%) fueron rasgados con una punta de plástico estéril. Se tomaron fotografías en campo claro, siempre en el mismo punto, a las 0 h, 18 h y 24 h con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) equipado con una cámara digital. El proceso de cierre fue cuantificado al relativizar las mediciones del tamaño de la herida a los diferentes tiempos con el tamaño inicial de la misma.

6.5. Ensayo de estabilidad de proteínas.

Para el estudio de la estabilidad de la proteína Snail1 en MEFs, los cultivos celulares a 60-70% de confluencia, fueron tratados con el inhibidor de la traducción proteica cicloheximida (Sigma) a una concentración de 20 μ M. Las células fueron recogidas a los 0, 15, 30, 60 y 120 min después del inicio del tratamiento analizando posteriormente los niveles de Snail1 mediante Western-blot.

7. ESTUDIOS *IN VIVO*.

7.1. Tratamiento de la piel con TPA.

Un día antes del tratamiento, el dorso de los animales fue afeitado. Se aplicaron tópicamente 12,5 μ g de TPA, diluido en 200 μ l acetona, cada dos días durante una semana a animales de aproximadamente 2 meses de edad de los distintos genotipos. Tras el experimento, los ratones fueron sacrificados y las pieles fueron recogidas para análisis por histología (parafina), inmunohistoquímica (parafina) e inmunofluorescencia (OCT).

7.2. Carcinogénesis química de piel.

Para estos experimentos se utilizaron animales transgénicos $L2^{+/+}$, $L2^{-/-}$, $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de edades comprendidas entre 8 y 12 semanas que fueron sometidos al protocolo de carcinogénesis experimental DMBA-TPA (Yuspa et al., 1996). Brevemente, los ratones fueron afeitados 24 h antes de iniciar el tratamiento consistente en la aplicación tópica de una única dosis del carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (62,5 μ g) seguida de dos dosis por semana del éster de forbol 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (12,5 μ g) durante 16 semanas. Cada dos semanas se examinó la piel de los animales y se midieron los tumores con un calibre hasta el final del experimento (semana 28-30). Tras el sacrificio de los animales se tomaron muestras de las lesiones inducidas y de todos los órganos y se embebieron en bloques de parafina.

7.3. Análisis por citometría de flujo de muestras de pulmón, sangre y médula ósea.

Tras la necropsia de los animales del modelo de cáncer de mama *PyMT*, se extrajeron cuidadosamente los pulmones y se procesaron cortando los órganos y sometiéndolos a digestión con colagenasa al 0,1% (Sigma Aldrich) a 37°C en agitación durante 1 h. Posteriormente, el tejido fue disgregado con ayuda de jeringuillas y agujas. Las suspensiones celulares fueron pasadas por filtros de 70 μ m (Falcon) y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las

muestras de sangre fueron obtenidas directamente del corazón de animales recién sacrificados y depositadas en tubos anticoagulantes (EDTA). Los glóbulos rojos fueron lisados con el tampón de lisis ACK (Gibco) y el resto de las células se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las células de la médula ósea se obtuvieron tras inyectar repetidas veces 1ml de PBS por el interior de las tibias y fémures de animales recién sacrificados hasta vaciar su contenido.

Aproximadamente 2×10^6 células de cada tejido se incubaron con los anticuerpos primarios anti-CD11b y anti-Gr1 conjugados con fluorocromos (Tabla 4) durante 45 min a 4°C. Las muestras fueron posteriormente analizadas por un citómetro CITOMICS FC-500 MPL (Beckman Coulter) mediante los programas de adquisición y análisis MXP y CXP, respectivamente (Beckman Coulter).

7.4. Ensayos de metástasis espontánea y experimental.

$1,5 \times 10^6$ células PyMT-*GFP-Luc* infectadas con los vectores adenovirales Adeno-*GFP* o Adeno-*Cre* fueron suspendidas en 100 μ l de PBS e inyectadas en la grasa de la glándula mamaria (ensayo de metástasis espontánea) o en la vena de la cola (ensayo de metástasis experimental) de ratonas inmunodeprimidas de 8-10 semanas de edad (Moreno-Bueno et al., 2011). Los animales fueron monitorizados semanalmente por bioluminescencia tras la inyección retro-orbital (100 μ l) del compuesto D-luciferina (50 mg/Kg en PBS), sustrato de la enzima luciferasa. El seguimiento fue llevado a cabo en una cámara IVIS Lumina II (PerkinElmer) y los datos obtenidos fueron tratados con el programa Living Software. Las dimensiones de los tumores fueron adicionalmente adquiridas mediante el uso de un calibre. Para todos los experimentos de inyección de células y el seguimiento *in vivo*, los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano/oxígeno, según los protocolos establecidos por el Comité de ética para la experimentación animal de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI-25-587).

8. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS.

8.1. Generación de bloques de parafina.

Los tejidos y tumores utilizados en este trabajo se fijaron en formol al 10% (Merck) durante 24 h, siendo posteriormente deshidratados en baños progresivos de 30 min de etanol al 25%, 50%, 75%, 80% y 100% y finalmente se incubaron en xilol (Merck) durante 24 h. Las muestras se incluyeron en un baño de xilol:parafina (1:1) a 55°C durante 16 h. A continuación, se embebieron en soportes metálicos rellenos con parafina (DC Panreac) a 55°C y el bloque

se dejó enfriar hasta su solidificación. Una vez obtenidos los bloques, se cortaron en secciones de 5 μm con un micrótopo (Microtomo Rotatorio Minot, Leica), y se depositaron sobre portaobjetos tratados para favorecer la adhesión del tejido (VWR International).

8.2. Generación de bloques de OCT.

Los bloques de OCT se generaron utilizando el medio “Optimal Cutting Temperature” (Takara). Las muestras frescas se incluyeron y se orientaron en un soporte Tissue Teck (Dako) que se rellenó con OCT y fue colocado en nitrógeno líquido (pieles) o sobre nieve carbónica (resto de tejidos). Una vez congelados, los bloques se almacenaron a -80°C . Posteriormente, se cortaron en secciones de 5 μm utilizando el criostato Reichert-Jung Cryocut 1900 (Leica) y las secciones se depositaron en portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

8.3. Tinción con hematoxilina/eosina.

Las secciones de tejido se desparafinaron con xilol (20 min), se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 75% y 50%) y finalmente en agua destilada. Las muestras se tiñeron con hematoxilina (DC Panreac) durante 5 min a temperatura ambiente y el exceso de tinción se eliminó con 3 lavados de 5 min en agua corriente. A continuación, se llevó a cabo una contra-tinción con eosina (DC Panreac) 1 min a temperatura ambiente seguida de varios lavados con agua. Finalmente, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de etanol (50%, 70%, 95% y 100%), se aclararon con xilol (20 min) y se montaron con Depex (BDH Prolabo).

9. ANÁLISIS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

9.1. Tinción con rojo sirio.

Para la tinción con rojo sirio, se realizaron secciones de 5 μm procedentes de bloques de OCT que fueron fijadas 20 min en paraformaldehído 4% a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min con PBS, los núcleos celulares de los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Weigert's (Sigma Aldrich) durante 3 min a temperatura ambiente y se lavaron durante 10 min con agua corriente. Seguidamente, las preparaciones fueron sumergidas en 0,1% rojo sirio (Direct Red 80; Sigma Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron con agua corriente hasta que la muestra ya no era capaz de teñir el agua. Por último, las tinciones se deshidrataron en baños progresivos de etanol al 50%, 70%, 95% y 100% y se introdujeron en xilol 5 min antes de montarse con Depex (BDH Prolabo). Las preparaciones se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81 acoplado a un analizador (U-ANT;

Olympus) y a un polarizador (U-POT; Olympus), orientados en paralelo y ortogonalmente uno con el otro, que estaba equipado a una cámara Sopt Flex. La cuantificación del colágeno fibrilar se realizó calculando la media del porcentaje del área birrefringente de, al menos, 5 zonas de cada tumor analizado (Levental et al., 2009).

9.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

El análisis por microscopía de fuerza atómica se realizó en colaboración con la Dra. Valerie Weaver (USCF, USA). Se llevaron a cabo en muestras tumorales de los modelos de cáncer de mama *PyMT*, congeladas y embebidas en OCT, que se cortaron en secciones de 30 μm . Cada sección fue cubierta de PBS que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas, así como yoduro de propidio para visualizar la parte celular. Este procedimiento se realizó como se describió previamente (Lopez et al., 2011). Brevemente, las mediciones por AFM se realizaron con un microscopio invertido de fuerza atómica MFP3D-BIO (Asylum research) acoplado a un microscopio invertido de fluorescencia Nikon TE00-U, disponible en el grupo de la Dra. Valerie Weaver. Para realizar las mediciones, se utilizó una micropalanca de nitrito de silicio que llevaba unida una punta de cristal de borosilicato (Novascan Tech). La micropalanca fue calibrada usando el método de oscilación termal (Lozano et al., 2010). Los campos de fuerza se tomaron de regiones de 40 μm x 40 μm del tumor ricas en estroma. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software Hertz model in Igor Pro (Wavemetrics). Se utilizó un coeficiente de Poisson de 0,5 para el cálculo del módulo elástico de Young (Alcaraz et al., 2003).

10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

10.1. Análisis de proteínas mediante Western blot.

Los extractos proteicos procedentes de cultivos celulares se obtuvieron lisando las células durante 15 min en tampón RIPA (0,1% SDS, 0,5% deoxicolato sódico, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 20 ng/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato) (Sigma Aldrich). En el caso de los tejidos, las muestras fueron, además, trituradas con un homogeneizador. Los lisados se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 20 min y el sobrenadante, conteniendo las proteínas, se aisló para la evaluación de la concentración proteica mediante el método BCA (Thermo Scientific). Las muestras cuantificadas se guardaron a -80°C hasta su uso.

Entre 40-50 µg de los diferentes extractos se resolvieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE de acrilamida (concentración 7-12%). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (Milipore) utilizando tampón de transferencia (20% metanol, 10% Tris-glicina pH 8,8) durante toda la noche a 250 mA. La unión inespecífica de anticuerpos a la membrana se bloqueó mediante incubación de 1 h con tampón PBS-Tween (0,01%) conteniendo 5% de leche desnatada. Las membranas se incubaron, a continuación, con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 4) toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 min con TBS-Tween, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 5), durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia usando el kit de detección ECL *chemiluminescence detection kit* (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres repeticiones.

10.2. Análisis por inmunofluorescencia (IF).

Para el análisis por IF en células, el cultivo se dejó crecer hasta alcanzar el 80% de confluencia en placas P60 con cristales de 10/12 mm de diámetro. Las células fueron fijadas de acuerdo con el antígeno y anticuerpos a utilizar (Tabla 4) y permeabilizadas, en su caso, con Triton-X100 0,1% (Sigma Aldrich) en PBS 5 min. Para los análisis por IF en tejidos, se cortaron secciones de 5 µm de bloques de OCT y se fijaron en metanol y acetona (-20°C, 4 min y 2 min, respectivamente). Seguidamente, las preparaciones fueron bloqueadas con el agente EnVision Flex Antibody Diluent (Dako) durante 45 min a 37°C e incubadas a esa temperatura durante 1 h con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes conjugados con fluoróforos (Tabla 4 y 5), tal y como se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009). Las tinciones fueron visualizadas con un microscopio confocal LSM710 (Zeiss).

10.3. Análisis por inmunohistoquímica (IHQ).

Las tinciones por IHQ se realizaron en secciones procedentes de bloques de parafina de 5 µm de grosor. El protocolo que se siguió fue idéntico al descrito previamente por nuestro grupo (Moreno-Bueno et al., 2009; Moreno-Bueno et al., 2011) siguiendo las instrucciones del kit EnVision™+ Kits (Dako). Los anticuerpos utilizados se encuentran recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos primarios.

Proteína	Especie (tipo)	Procedencia	Fijación/ Permeabilización	Dilución WB/IF/IHQ/C
Lox	Conejo (pc)	K. Csiszar	-----	1:1000/--/--
Loxl1	Conejo (pc)	K. Csiszar	-----	1:1000/--/--
Loxl2	Conejo (pc)	K. Csiszar	Formaldehído 10%/TX100	1:1000/--/1:200/--
Loxl3	Conejo (pc)	K. Csiszar	-----	1:1000/--/--
Cadherina-E	Rata (mc; ECCD2)	M. Takeichi	Metanol/Acetona	1:500/1:200/--/--
Cadherina-N	Ratón (mc)	Zymed	Metanol/Acetona	1:500/1:200/--/--
Snail1	Ratón (mc; L7062)	Cell Signaling	-----	1:500/--/--
Loricrina	Conejo (pc)	Covance	Metanol/Acetona	1:1000/1:1000/--/--
Citokeratina 1	Conejo (pc)	Covance	Metanol/Acetona	1:1000/1:1000/--/--
Citokeratina 10	Conejo (pc)	Covance	Metanol/Acetona	1:1000/1:1000/--/--
Citokeratina 5	Conejo (pc)	Covance	Etanol	1:1000/1:1000/--/--
Claudina-1	Conejo (pc)	Zymed	Metanol/Acetona	1:500/1:100/--/--
Integrina $\beta 4$	Rata(mc:346-11A)	BD Pharmingen	Metanol/Acetona	--/1:200/--/--
Colágeno IV	Conejo (pc)	Abcam	Metanol/Acetona	--/1:250/--/--
Colágeno I	Conejo (pc)	Rockland	Metanol/Acetona	--/1:250/--/--
Fibronectina	Ratón (mc)	BD Transduction	Metanol/Acetona	--/1:250/--/--
Elastina	Conejo (pc)	Elastin Products Company	Metanol/Acetone	--/1:250/--/--
β -catenina	Ratón (mc)	BD Transduction	Metanol/Acetone	--/1:500/--/--
γ -Catenina	Ratón (mc)	BD Transduction	Metanol/Acetone	1:500/1:500/--/--
α -tubulina	Ratón (mc)	Sigma		1:10000/--/--
Ki67	Conejo (pc)	Master Diagnostica	Formaldehído 10%/TX100	--/--/prediluido/--
WT1	Conejo (pc)	Santa Cruz	Formaldehído 10%/TX100	--/--/1:400/--
Caspasa 3	Conejo (pc)	RyD Systems	Formaldehído 10%/TX100	--/--/1:300/--
AR	Conejo (pc)	Santa Cruz	Formaldehído 10%/TX100	--/--/1:50/--
CD11b-FITC	Conejo (pc; M1/70)	BD Pharmingen		--/--/--/1:100
Gr1-PE	Conejo (pc; RB6- 8C5)	BD Pharmingen		--/--/--/1:100
CD11b-PECy7	Conejo (pc)	BD Pharmingen		--/--/--/1:100

WB: Western blot; IF: Immunofluorescencia; IHQ: Immunohistoquímica; C: Citometría
pc: anticuerpo policlonal mc: anticuerpo monoclonal; TX100: Tritón X-100

Tabla 5. Anticuerpos secundarios

ANTICUERPO	ESPECIE	APLICACIÓN		PROCEDENCIA
		WB	IF	
Anti-conejo-HRP	Cabra	1:5000	-----	GE Healthcare
Anti-ratón-HRP	Cabra	1:5000	-----	GE Healthcare
Anti-rata-HRP	Cabra	1:5000	-----	GE Healthcare
Anti-conejo Alexa 488/546/647	Cabra	-----	1:500	Molecular Probes
Anti-ratón Alexa 488/546/647	Cabra	-----	1:500	Molecular Probes
Anti-rata Alexa 488/546/647	Cabra	-----	1:500	Molecular Probes

WB= Western blot; IF: inmunofluorescencia

Espectros de emisión= 488: fluorescencia verde; 546: fluorescencia roja; 647: fluorescencia en rojo lejano

11. ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO.

11.1. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.

El RNA de células y tejidos (papilomas, tumores de mama y pulmones) se extrajo mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi utilizando trizol (Chomczynski and Sacchi, 1987). Las células, cultivadas en placas P100 al 60-70% de confluencia, fueron recogidas con 1 ml de trizol. En el caso de los tejidos, éstos fueron suspendidos también en 1 ml de reactivo y disgregados con ayuda de un sonicador. A continuación, se añadió y mezcló 0,2 ml de cloroformo, centrifugándose durante 15 min a 13.000 r.p.m. La fase superior (acuosa) se aisló, y se añadieron 0,5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA. Tras la precipitación, los tubos se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Después de otra centrifugación, se eliminó el etanol y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA se resuspendió en 10-50 µl de agua libre de nucleasas. La cantidad y calidad del RNA se evaluó con un espectrofotómetro (ND-1000).

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se retrotranscribieron 2 µg del RNA total con la enzima MLV-RT (Promega), utilizando oligo-dT como cebador. Para la reacción se empleó el siguiente protocolo: 5 min a 70°C y 1 h a 42°C, tal y como está descrito (Moreno-Bueno et al., 2009).

11.2. Análisis de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa.

Cada PCR se realizó a partir de 100 ng de cDNA, empleando el reactivo REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma Aldrich) y los oligonucleótidos correspondientes a una concentración final de 0,5 μ M (Tabla 6). Las condiciones de estas reacciones son similares que las de la PCRs de genotipaje, variando únicamente el número de ciclos, que oscilaba entre 28 y 32.

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para PCR semicuantitativa.

ALELO	OLIGONUCLEÓTIDO FW	OLIGONUCLEÓTIDO RW	TAMAÑO AMPLICIÓN
<i>Lox</i>	acaaccgcaccgcctctaccc	tgatgtcctgttagcgaatgtc	800 pb
<i>Lox12</i>	aagtgggctatgtagaggccaag	aggctttggggttaggtcttc	350 pb
<i>Lox13</i>	gggactcaggaatgtaactgag	ctggttactagtctggccaggg	800 pb
<i>GAPDH</i>	tgaaggtcggtgtgaacggatttggc	catgtaggccatgaggtccaccac	900 pb

11.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Para la realización de los análisis de qPCR se empleó el kit “SYBR Green Supermix” (BioRad) utilizando una pareja de cebadores específicos contra los genes de interés a una concentración de 0,5 μ M (Tabla 7). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Iq5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad) asociado al programa iQ5 Optical System Software. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado con 20 ng de cDNA y las condiciones fueron las mismas para todos los genes analizados:

- 5 min a 95°C
- (15 seg a 95°C , 30 seg a 62°C, 30 seg a 72°C) x 40 repeticiones
- 10 min a 72 °C
- 10 seg a 55°C, incrementando la temperatura 0,5°C en cada ciclo hasta alcanzar los 95°C (81 ciclos en total), para la determinación de la curva de fusión.

La expresión génica se calculó mediante el método Δ Ct, determinando el número de copias del gen de interés frente al gen de expresión constitutiva *β -actina* según la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = 2^{Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{problema}}}$$

Donde ΔCt es la expresión normalizada del gen de interés frente a la expresión del gen constitutivo; Ct es el ciclo umbral; control es el gen de expresión constitutiva, y problema el gen de interés.

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para qRT-PCR.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO FW	OLIGONUCLEÓTIDO RW
<i>Lox</i>	CCTTCAGCCACTCTCCTCTG	GCACAGCTGTCACCAACATT
<i>Loxl1</i>	GCCAGTGGATCGACATAACTG	ACAATGTACTTGGGGTTCACG
<i>Loxl3</i>	ATCCACAACCTAGGAAGAGCTG	TGGTAATGCCCATGACACTC
<i>Loxl4</i>	GGTTGCACAACTGCCACA	GGGAGTGCAGTAATGGCTT
<i>β-actina</i>	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
<i>Notch 1</i>	GAATGGAGGTAGGTGCGAAG	TCTTACACGGTGTGCTGAGG
<i>Hes 1</i>	TCTGGAAATGACTGTGAAGCA	GTCACCTCGTTCATGCACTC
<i>Hey 1</i>	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC	ACCCCAAACCTCCGATAGTCC
<i>p53</i>	AATGTCTCCTGGCTCAGAGG	CTAGCATTCAAGGCCCTCATC
<i>Involucrina</i>	GATATGGCAGGGGATCAGAA	ACTCCTGGTGCTGCTGTTTT
<i>Loricrina</i>	TCCCTCACTCATCTTCCCTG	GAGGTCTTTCCACAACCCAC
<i>K1</i>	CTAAGTTTTGGGTCCGGGT	AGTTTGCCTCCTTCATCGAC
<i>Jagged1</i>	CGGGATGGAAACAGCTCAC	CACCAAGCAACAGACCCAAG
<i>S100A8</i>	GGAAATCACCATGCCCTCTACAA	ATGCCACACCCACTTTTATCA
<i>S100A9</i>	GGAGCGCAGCATAACCACCATC	GCCATCAGCATCATACACTCCTCA
<i>VEGF</i>	GGCTTTACTGCTGTACCTCCA	ACAGGACGGCTTGAAGATGTA
<i>GM-CSF</i>	CGTCTTAACGAGTTCTCCTTC	CCCTTGAGTTTGGTGAAATTGC
<i>Tenascina-C</i>	AACCTGATGGGCAGATATGG	CCAGATTTCGGAAGTTGCTG
<i>TNFα</i>	GCCTCTTCTCATTCTGCTT	CTCCTCCAATTGGTGGTTTG
<i>Fibronectina</i>	TCTCAGCAAATAACGATGCTG	CCAGGTGCACAAGCAACA

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

En todos los experimentos, los análisis estadísticos se realizaron aplicando la prueba t de Student. Se consideró significativo un valor $P < 0,05$.

Resultados

1. GENERACIÓN DEL MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO CONDICIONAL DE SOBREEXPRESIÓN DE LOXL2.

Con el objetivo de estudiar “*in vivo*” los efectos de la sobreexpresión de *Loxl2* en condiciones fisiológicas y tumorales, decidimos generar un modelo de ratón transgénico condicional de ganancia de función. Para ello, seguimos una estrategia de “*gene targeting*” basada en la recombinación homóloga del vector de interés en el *locus Rosa26* (*R26*) (Nyabi et al., 2009), que permite una expresión ubicua y continuada en el tiempo del gen que queremos sobreexpresar. El vector a insertar incorporaba una secuencia *SA* (“*splicing acceptor*”) en el extremo 5’, una caja (*cassette*) de resistencia a neomicina con una señal de parada de la transcripción (*PGK-neo-STOP*), flanqueados por dos sitios *loxP*, seguida de una copia del cDNA de *Loxl2* y de la región codificante del gen reportero GFP, separadas ambas por una secuencia IRES (Figura 13A) que permite la lectura bicistrónica del mRNA resultante. Este vector se electroporó en células madre embrionarias de ratón (*Embryonic Stem Cells: ESCs*), de la cepa híbrida C57BL/6 y 129Sv, incorporándose en el *locus R26* mediante recombinación homóloga entre los exones 1 y 2 (Figura 13A), de modo que la transcripción del cDNA exógeno de *Loxl2* quedaba bajo el promotor de *R26*. Los clones positivos (3 de 50) fueron seleccionados y confirmados mediante PCR diagnóstica utilizando los oligonucleótidos correspondientes (Figura 13B). Posteriormente, uno de los clones se agregó en mórulas de ratones CD1 obteniéndose animales quiméricos. Los fundadores de la colonia transgénica condicional ($R26^{+/STOPL2}$) fueron generados a partir de aquellos animales quiméricos capaces de transmitir el transgén a través de la línea germinal. A continuación, estos ratones condicionales se cruzaron con la cepa *CMV-Cre*, que expresa de manera constitutiva y ubica la recombinasa Cre (Figura 13A). Dicha recombinasa, al actuar específicamente sobre los sitios *loxP*, escindió el *cassette PGK-neo-STOP* permitiendo la expresión constitutiva de *Loxl2*. Con el objetivo de conseguir una sobreexpresión mayor de la proteína, ratones heterocigotos ($R26^{+/L2}$) se cruzaron entre sí para generar la cepa homocigota ($R26^{L2/L2}$). La sobreexpresión de *Loxl2* se confirmó a nivel de RNA y de proteína (tanto a nivel intracelular como extracelular) en MEFs (Figura 13C). Además, se pudo detectar la expresión de GFP mediante análisis de fluorescencia *in vivo* en ratones P0 (neonatos) (Figura 13D). Con la finalidad de profundizar en las funciones de *Loxl2* en un contexto fisiológico, gran parte del trabajo de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en paralelo con el ratón “*knock-out*” (KO) de *Loxl2* ($L2^{-/-}$) previamente generado en el laboratorio (ver materiales y métodos), lo que ha contribuido a dar una mayor significancia biológica a los resultados detallados a continuación.

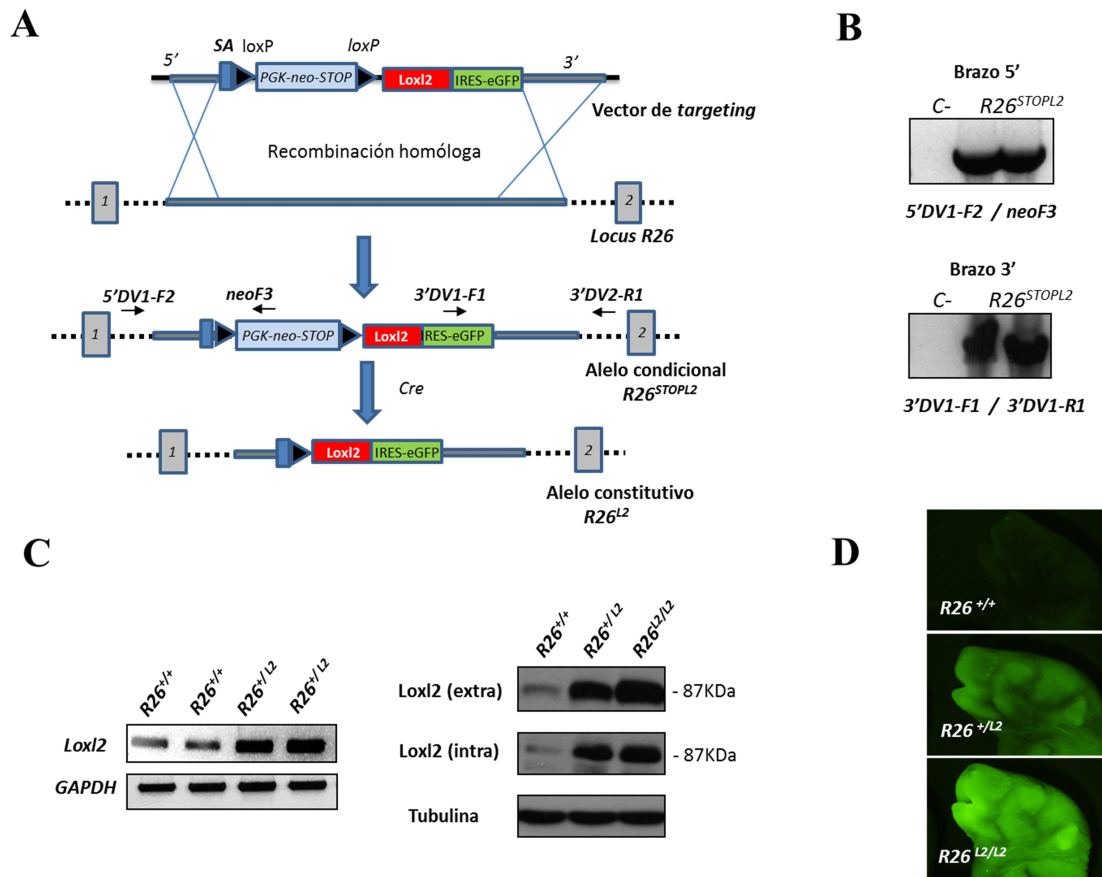


Figura 13. Estrategia de recombinación homóloga. (A) Representación esquemática de las diferentes variantes de alelos *ROSA26* (*R26*) de este estudio. El vector de recombinación homóloga (vector de *targeting*) contiene una señal aceptora de *splicing* (SA), una caja *PGK-neo-STOP* (resistencia a neomicina y señal de parada transcripcional) (azul), flanqueada por dos sitios *loxP* (triángulos negros), y el cDNA de *Loxl2* (rojo) seguido por la secuencia IRES y la región codificante de *GFP* (verde). El alelo *R26*^{STOPL2} se generó por recombinación homóloga en el locus *R26*. Después de la escisión mediada por la recombinasa Cre, la caja *PGK-neo-STOP* es eliminada y el tándem *Loxl2/GFP* es expresado bajo el control del promotor *R26* (alelo *R26*^{L2}). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las reacciones de PCR están también indicados. (B) Análisis por PCR diagnóstica de los clones de células ES positivos para los alelos recombinantes. Un control negativo se utilizó en paralelo (C-). (C) Análisis por PCR semicuantitativa (panel izquierdo) y Western blot de medio condicionado (extra) y extractos intracelulares (intra) (panel derecho) de MEFs de los genotipos indicados. *GAPDH* y α -tubulina fueron usados como controles de carga en los análisis por PCR y Western blot, respectivamente. (D) Imágenes de fluorescencia (GFP) de ratones neonatos de los genotipos indicados.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA LOXL2.

2.1. Caracterización del ratón KO de *Loxl2* (*L2*^{-/-}).

El análisis de las camadas procedentes de parentales heterocigotos (*L2*^{+/-}) reveló que las crías de los ratones KO de *Loxl2* (*L2*^{-/-}) llegaban al destete con una frecuencia inferior a la esperada (Figura 14 A, fila superior). Dado que a mitad de la gestación (día 13,5 después del parto) se observaron números normales de ratones de todos los genotipos (Figura 14A, fila inferior), decidimos estudiar los ratones recién nacidos. Justo después del parto (P0) y a P1, algunos neonatos parecían gravemente afectados, con una apariencia cianótica, y terminaban

muriendo a las pocas horas, siendo el porcentaje de animales KO vivos a P1 del 13,2 %, aproximadamente la mitad de la progenie esperada (Figura 14A, fila intermedia).

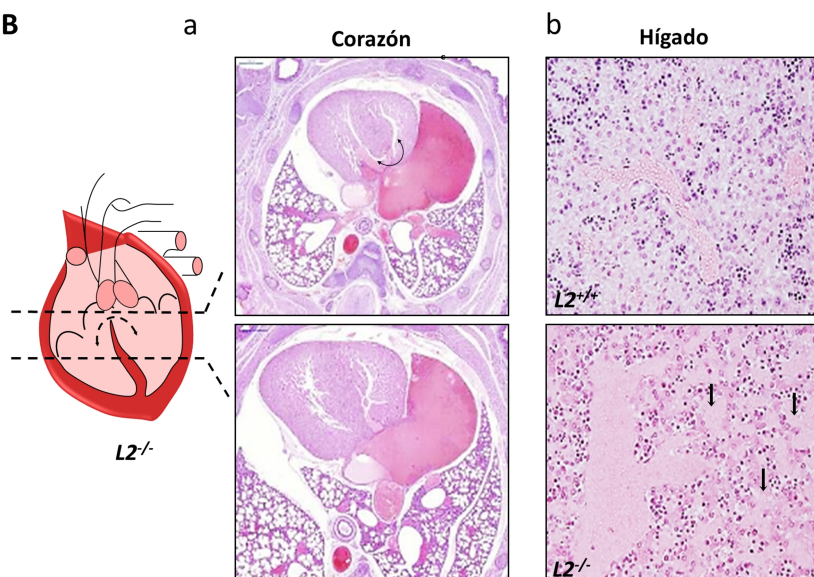
Los neonatos muertos fueron sujetos a un análisis histopatológico para intentar determinar la causa de la muerte. Aunque no se pudo identificar un defecto consistente presente en todos los animales $L2^{-/-}$ afectados, se detectaron algunas anomalías en 2 de 8 ratones muertos, que mostraban un problema congénito en el corazón debido a la formación incompleta o ruptura del septo ventricular (Figura 14B a) que explicaría la muerte de, al menos, estos dos animales. Esta alteración estaba acompañada en algunos casos por una distensión de los capilares sanguíneos del hígado (Figura 14B b). Además, encontramos un animal KO con una arquitectura normal en el corazón pero que presentaba esta alteración de la vasculatura hepática. Estos datos sugieren que la ausencia de *Loxl2* afecta a la morfogénesis cardíaca y a la vasculatura hepática con diferente penetrancia, pudiendo ser responsable de la muerte de los animales afectados. Cabe destacar que no se encontraron problemas, aparentemente, en ninguno de los ratones KO para *Loxl2* durante la edad adulta y el análisis histológico de los órganos no mostró ninguna anomalía (datos no mostrados).

A

	$L2^{+/+}$	$L2^{+/-}$	$L2^{-/-}$
Después del destete n= 253	% Esperado: 25,0 % Observado: 31,5	% Esperado: 50,0 % Observado: 57,8	% Esperado: 25,0 % Observado: 10,7
P1 n=137	% Esperado: 25 % Observado: 25	% Esperado: 50,0 % Observado: 52,9	% Esperado: 25,0 % Vivos: 13,2 % Muertos: 8,9
E13.5 n=60	% Esperado: 25 % Observado: 25	% Esperado: 50 % Observado: 50	% Esperado: 25 % Observado: 25

Figura 14. Caracterización fenotípica del ratón KO de *Loxl2*. (A) Porcentaje de ratones vivos comparado con la frecuencia mendeliana esperada en animales silvestres, heterocigotos y KO a mitad de la gestación (E13.5), P1 y después del destete. Los valores mendelianos que reflejan la letalidad perinatal están resaltados en negrita.

B



(B) a) Esquema y H&E de secciones transversales del corazón procedente de un ratón *Loxl2* KO muerto mostrando la alteración encontrada en el septo ventricular (panel superior). Las flechas curvas señalan la zona donde se aprecia la comunicación entre los dos ventrículos del corazón afectado. b) Secciones de H&E de hígados de ratones neonatos $L2^{+/+}$ y $L2^{-/-}$. Las flechas indican regiones con distensión capilar (panel inferior).

Para obtener información adicional sobre los órganos que podrían estar afectados por la pérdida de *Loxl2*, varios tejidos de ratones neonatos (P1) WT y KO fueron examinados para la expresión de la proteína mediante Western blot. Así, *Loxl2* se detectó abundantemente en corazón y pulmón y en menor cantidad en riñón (Figura 15). Por el contrario, no fuimos capaces de encontrar niveles detectables en cerebro e hígado (Figura 15 y datos no mostrados). Los altos niveles detectados en el corazón estarían, por tanto, apoyando la existencia de problemas cardiacos en los ratones *L2^{-/-}*. La expresión del resto de los miembros de la familia *Lox* se mantuvo prácticamente inalterada en los tejidos analizados en ausencia de *Loxl2*, a excepción de *Loxl3*, cuyos niveles eran relativamente inferiores en los extractos de corazón procedentes de animales KO para *Loxl2* en relación con ratones WT (Figura 15). Los niveles de *Loxl4* no pudieron ser evaluados debido a la inexistencia de anticuerpos eficientes que reconozcan a la proteína.

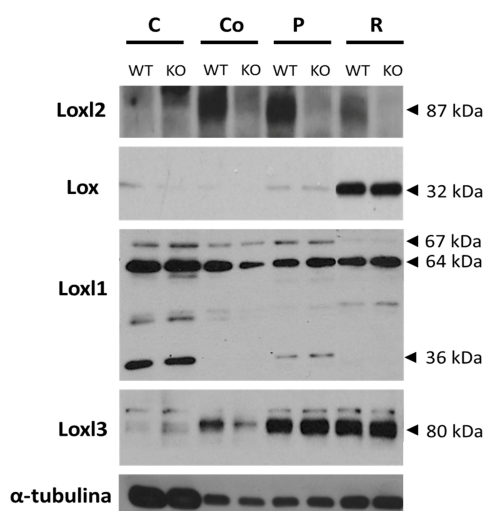


Figura 15. Expresión de los miembros de la familia lisil oxidasa en ratones neonatos de la línea KO de *Loxl2*. Análisis mediante WB de *Loxl2*, *Lox*, *Loxl1* y *Loxl3* en distintos órganos de ratones WT y KO para *Loxl2*. Se utilizó α -tubulina como control de carga. C: cerebro; Co: corazón; P: pulmón; R: riñón.

2.2. Caracterización fenotípica del ratón de sobreexpresión de *Loxl2* (*R26^{L2/L2}*).

Tanto las hembras como los machos que sobreexpresan constitutivamente *Loxl2* en homocigosis (*R26^{L2/L2}*) son viables, nacen según la frecuencia esperada y tienen una esperanza de vida normal (datos no mostrados). Sin embargo, el 90% de los machos homocigotos resultaron ser estériles. Esta característica fenotípica no se observó en ratones heterocigotos *R26^{+L2}*, sugiriendo que el efecto de *Loxl2* en la esterilidad es dosis-dependiente. Con la excepción del aparato reproductor masculino, no se detectaron alteraciones anatómicas en el resto de los tejidos analizados a pesar de que la sobreexpresión de la proteína era altamente eficiente, como muestra el análisis por Western blot llevado a cabo en los distintos órganos

(Figura 16). La expresión de los otros miembros de la familia no cambió en los tejidos analizados en respuesta a los altos niveles de *Loxl2* (Figura 16).

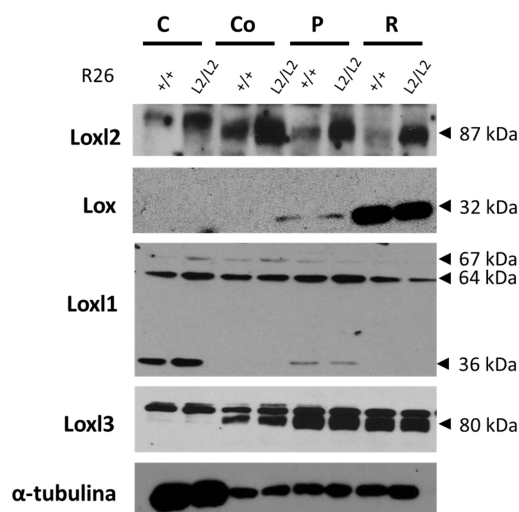


Figura 16. Expresión de los miembros de la familia lisil oxidasa en ratones neonatos de la línea de sobreexpresión de *Loxl2*. Análisis mediante Western blot de Loxl2, Lox, Loxl1 y Loxl3 en distintos órganos de ratones *R26*^{+/+} y *R26*^{L2/L2}. Se utilizó α -tubulina como control de carga. C: cerebro; Co: corazón; P: pulmón; R: riñón.

2.2.1. Defectos estructurales en los testículos y epidídimo.

El análisis de las gónadas de los machos *R26*^{L2/L2} a los tres meses de edad mostró una hiperplasia en el epidídimo (Figura 17A, panel izquierdo), así como una degeneración testicular heterogénea que afectaba al 60-70% del testículo (Figura 17B). Este efecto fue más acusado en ratones de un año de edad (Figura 17A, panel derecho).

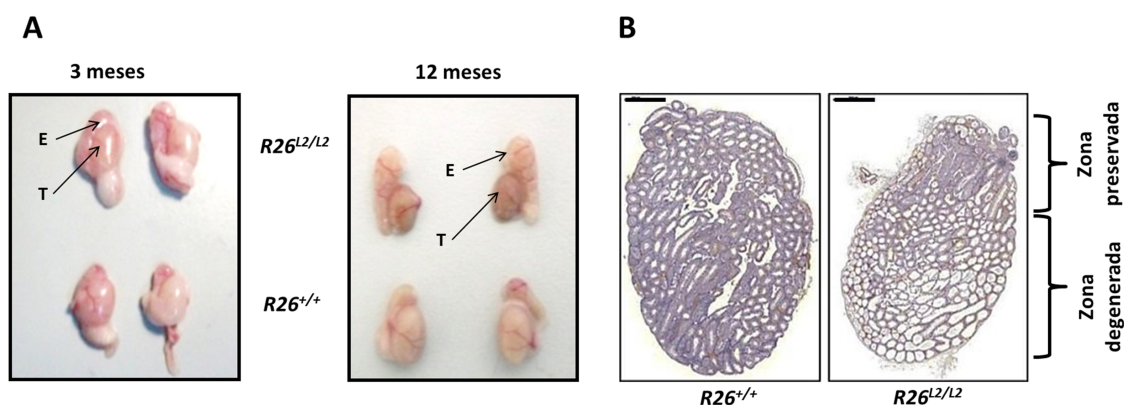


Figura 17. Defectos macroscópicos del aparato reproductor masculino en ratones que sobreexpresan *Loxl2*. (A) Vista general de los testículos (T) y epidídimos (E) de ratones control y de sobreexpresión de *Loxl2*. (B) Secciones macroscópicas de testículos de ratones *R26*^{+/+} y *R26*^{L2/L2} de 3 meses de edad. Barra de escala= 1000 μ m.

El testículo es el órgano donde se lleva a cabo la espermatogénesis. Fundamentalmente está compuesto por los túbulos seminíferos, en los cuales se encuentran tres tipos celulares principales: las células germinales, las células de Sertoli y las células de Leydig. Durante la espermatogénesis, las espermatogonias (células diploides) sufren un proceso de meiosis generando espermátidas (haploides) que finalmente maduran para dar lugar a los espermatozoides. Por su parte, las células de Sertoli tienen una función fundamentalmente de soporte de las células germinales y juegan un papel muy importante en la formación de la barrera hemato-testicular, encargada de proteger a los espermatozoides frente a la respuesta inmune propia. Finalmente, en el tejido intersticial que rodea a los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig, encargadas de la producción de andrógenos (Estrada E., 2002). Un análisis histológico más exhaustivo de los testículos de ratones $R26^{L2/L2}$ reveló que las zonas parcialmente degeneradas tenían los túbulos seminíferos dilatados y una densidad celular menor que los de testículos procedentes de ratones control $R26^{+/+}$ (Figura 18A). No obstante, se pudieron observar las típicas figuras meióticas características (datos no mostrados), encontrándose tanto espermátidas en distintos estadios de diferenciación como espermatozoides en el lumen de los túbulos de los ratones $R26^{L2/L2}$ (Figura 18A). A continuación, procedimos a analizar por inmunohistoquímica (IHQ) cambios potenciales en el estado de las distintas poblaciones celulares presentes en el testículo como posible causa de la esterilidad. La tinción con el marcador Ki67 mostró un menor número de células proliferativas (espermatogonias) en las zonas que estaban parcialmente degeneradas (Figura 18B a, panel central). Sin embargo, el patrón de expresión de Ki67 en las zonas inalteradas de los testículos $R26^{L2/L2}$ era indistinguible del observado en los testículos de los animales control (Figura 18B a, paneles superior e inferior). Además, el marcaje de Caspasa 3 (C3A) indicó que no había un aumento significativo de células apoptóticas en los testículos de los ratones $R26^{L2/L2}$ (Figura 18B b). Tampoco se observaron cambios en el número de células de Sertoli ni de Leydig, detectadas mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra los antígenos WT1 (*Wilms tumor gene*) y AR (receptor de andrógenos), respectivamente, en los testículos de ratones $R26^{L2/L2}$ al compararlos con sus controles (Figura 18B c y d). Estos resultados descartan que la causa de la esterilidad sea un problema inherente a la homeostasis testicular.

Por otro lado, en los testículos de ratones $R26^{L2/L2}$ destacó la presencia de espermatoceles, es decir, retenciones quísticas de fluido seminal que contiene espermatozoides (Figura 18C), que podrían estar indicando problemas en otras regiones del tracto genital, como el epidídimo.

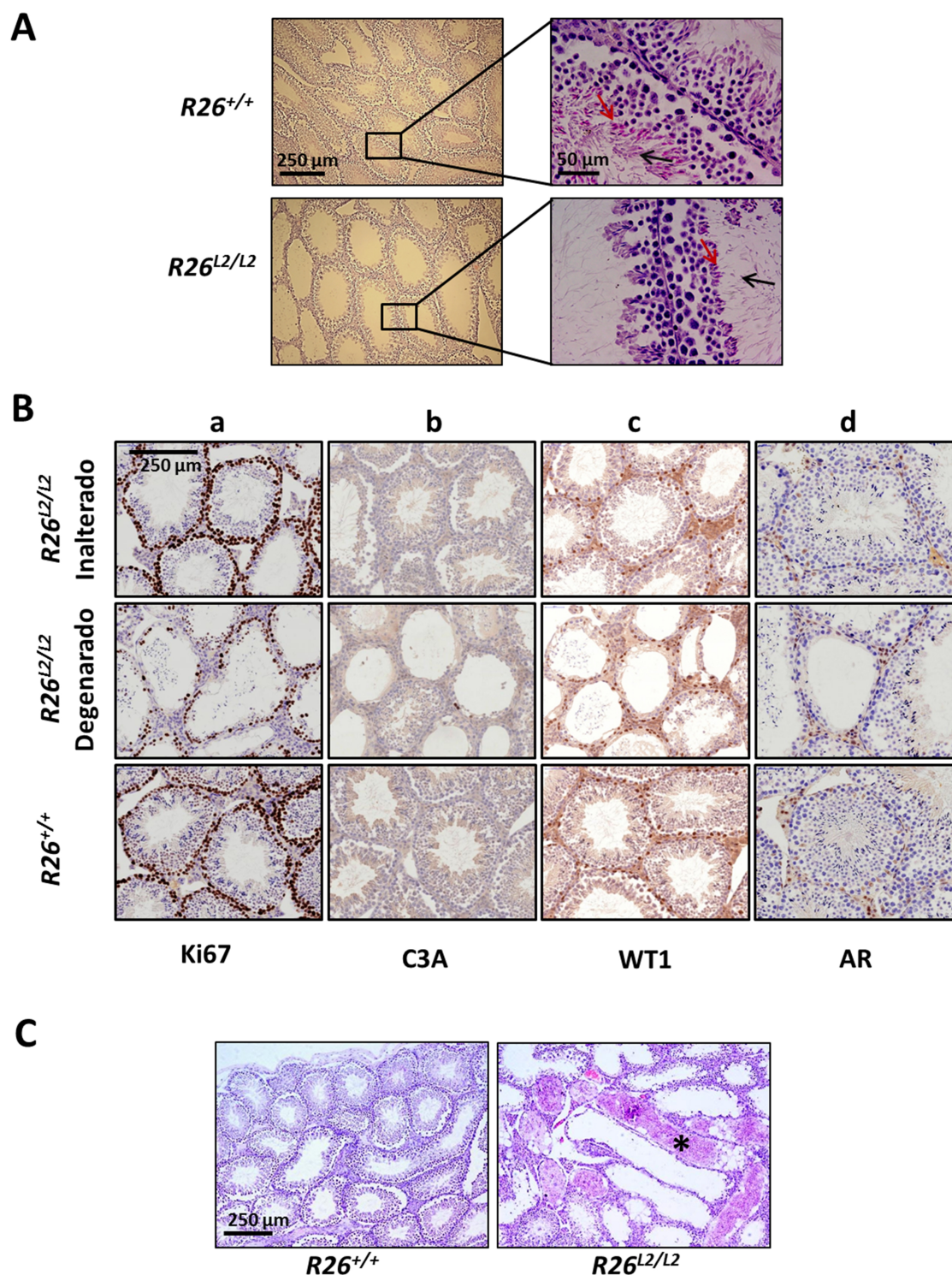


Figura 18. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los testículos. (A) H&E de secciones de testículos procedentes de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de 4 meses de edad (paneles izquierdos) acompañado de una ampliación detallada de un túbulo seminífero (paneles derechos) que muestran la presencia de células espermáticas maduras (flechas rojas) y espermatozoides (flecha negras) en los testículos de ratones de ambos genotipos. **(B)** Análisis por IHQ de testículos procedentes de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ (de regiones degeneradas e inalteradas) de 4 meses de edad para los marcadores Ki67 (a), caspasa 3 (C3A) (b), WT1 (*Wilms tumor gene*) (c) y el receptor de andrógenos (AR) (d). **(C)** H&E del testículo de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de 4 meses de edad que muestra la presencia de espermatocitos (asterisco) en los túbulos seminíferos de animales que sobreexpresan *Lox12*.

Tras abandonar el testículo, los espermatozoides se almacenan y terminan de madurar en los túbulos del epidídimo. Un estudio más profundo de este órgano en ratones jóvenes (3 meses) $R26^{L2/L2}$ reveló que los túbulos estaban distendidos, presentaban un componente inflamatorio y fibrótico, y mostraban un aumento del número y tamaño de capilares sanguíneos (Figura 19A, paneles superiores). En cuanto al componente epitelial, el epidídimo se compone de un epitelio pseudo-estratificado de células principales y basales que descansan sobre una lámina basal. En el caso de los epidídimos de ratones $R26^{L2/L2}$, destacó la presencia de células atróficas aplanadas y de zonas con metaplasia escamosa (Figura 19A, paneles intermedios). Además, se observó un incremento de la proliferación, tras la tinción con Ki67, de células epiteliales y del estroma en las muestras procedentes de ratones $R26^{L2/L2}$ (Figura 19B, paneles superiores). El análisis por IHQ mostró que *Loxl2* estaba localizada en el estroma del epidídimo (Figura 19B, paneles intermedios e inferiores), así como en las células basales del epitelio (Figura 19B, paneles inferiores). A partir de los cuatro meses, ya no se detectaban espermatozoides en el epidídimo de animales $R26^{L2/L2}$ (Figura 19A, paneles inferiores), indicando que los defectos observados son determinantes para la viabilidad de los gametos.

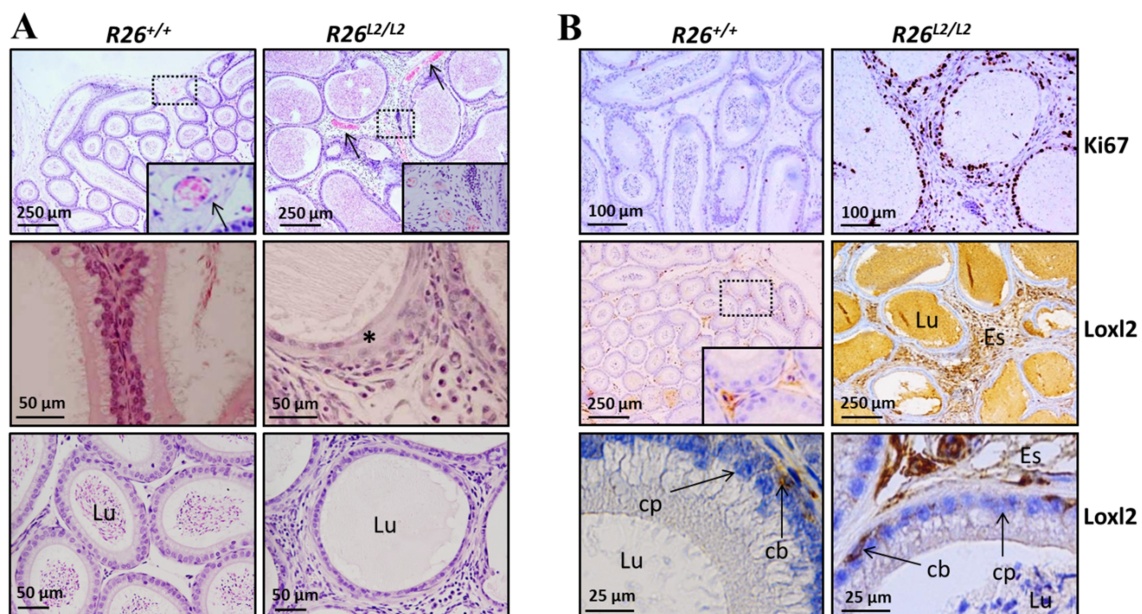


Figura 19. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los epidídimos. (A) Paneles superiores: Tinción con H&E de epidídimos de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de 3 meses de edad mostrando, en el caso de los ratones $R26^{L2/L2}$, una distensión de los túbulos, inflamación, fibrosis y un incremento en el número y diámetro de los capilares sanguíneos (flechas). En el caso de los ratones $R26^{+/+}$ se muestra una ampliación de un capilar de la zona que se indica. Para los ratones $R26^{L2/L2}$ se muestra una zona ampliada de una región inflamada y fibrótica. Paneles centrales: H&E mostrando la desorganización del epitelio en los túbulos del epidídimo de ratones $R26^{L2/L2}$ de 3 meses y una zona con metaplasia escamosa (asterisco). Paneles inferiores: H&E de ratones de 4 meses de edad que muestra la ausencia total de espermatozoides en el lumen de epidídimos de animales $R26^{L2/L2}$. (B) Paneles superiores: análisis por IHQ del marcador Ki67 en epidídimos de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de 3 meses de edad. Paneles centrales: tinción por IHQ mostrando la expresión de *Loxl2* en el estroma del epidídimo (en el caso de los animales $R26^{+/+}$ se muestra una región detallada de la zona indicada). Paneles inferiores: tinción por IHQ mostrando la expresión de *Loxl2* en las células basales del epitelio del epidídimo. Lu= lumen, Es= estroma, cp= célula principal, cb= célula basal.

2.2.2. Loxl2 reprime cadherina-E y claudina-1 en el epidídimo.

Un complejo mecanismo de uniones intercelulares es fundamental para mantener la estructura funcional del epidídimo. Esta maquinaria implica a numerosas proteínas de la familia de las claudinas, ZO, ocludinas y cadherinas (Cyr et al., 2007). La organización de estas proteínas es esencial para el mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria, la cual no sólo es importante para proteger los espermatozoides del sistema inmune, sino también para regular, a través de funciones endocíticas y de secreción, la composición del lumen del epidídimo (Cyr et al., 2007; Dube et al., 2010). De hecho, algunos casos de infertilidad masculina en humanos están causados por problemas en el epidídimo que impiden la correcta maduración de los espermatozoides (Sullivan, 2004).

Nuestro laboratorio demostró previamente que LOXL2 está implicada en la regulación de algunos componentes de uniones intercelulares como cadherina-E y claudina-1 en células de epitelios simples (mama) y estratificados (epidermis) (Moreno-Bueno et al., 2011; Peinado et al., 2005; Peinado et al., 2008). Por ello, decidimos estudiar el estado de diferentes proteínas de unión intercelular en los epidídimos de los ratones $R26^{L2/L2}$. El análisis mediante Western-blot mostró una marcada disminución de los niveles de claudina-1 en los epidídimos de ratones $R26^{L2/L2}$ de 3 meses, respecto a los controles, disminuyendo progresivamente con la edad hasta alcanzar niveles indetectables en animales de 9 meses, en los cuales los niveles de Loxl2 exógena eran mayores (Figura 20A). Asimismo, se detectó una disminución, progresiva con la edad, de la expresión de cadherina-E y γ -catenina (p120) en los epidídimos de ratones $R26^{L2/L2}$, sugiriendo, de nuevo, la existencia de un problema en las uniones intercelulares en los epidídimos de estos animales (Figura 20A). Sorprendentemente, el análisis de la localización de claudina-1 mostró que la supresión de su expresión solo se apreciaba en las células basales, sin afectar a la expresión en la zona apical de las células principales (Figura 20B, panel superior). Esta observación estaba de acuerdo con la localización de Loxl2 en las células basales (Figura 19B). La expresión de cadherina-E, sin embargo, parecía disminuir en ambos tipos celulares (Figura 20B, panel central). Estos resultados muestran la primera evidencia *in vivo* de la represión de cadherina-E y claudina-1 mediada por Loxl2.

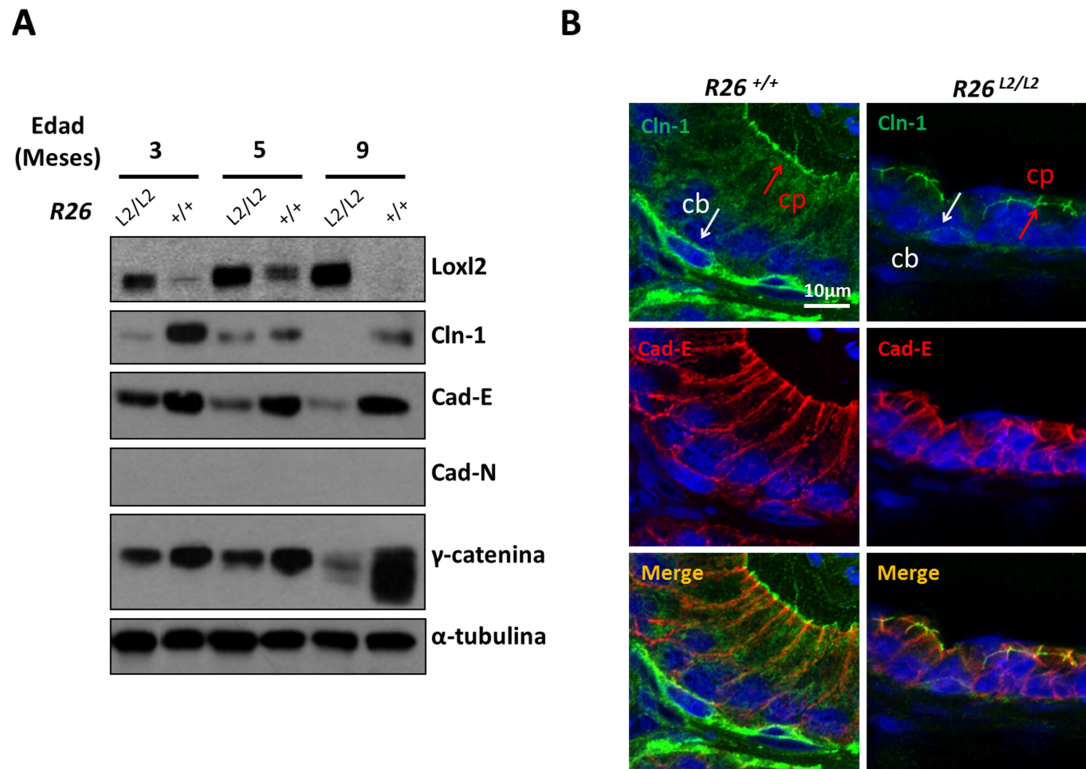


Figura 20. Expresión de proteínas de unión intercelular en los epidídimos. (A) Análisis por Western blot de Loxl2, cadherina-E (Cad-E), claudina-1 (Cln-1), cadherina-N (Cad-N) y γ -catenina de epidídimos procedentes de ratones *R26*^{+/+} y *R26*^{L2/L2} a 3, 5 y 9 meses de edad. Se utilizó α -tubulina como control de carga. (B) Imágenes de microscopía confocal de IFs de claudina-1 (Cln-1, verde) y cadherina-E (Cad-E, rojo) en secciones de tejido embebido en OCT de ratones *R26*^{+/+} y *R26*^{L2/L2} de 5 meses. Ambas IFs se muestran superpuestas en los paneles inferiores (Merge). Las flechas blancas y rojas indican las células basales (cb) y la parte apical de las células principales (cp), respectivamente.

2.2.3. La sobreexpresión de Loxl2 provoca fibrosis en el epidídimo.

Dada la implicación de la familia de las lisil oxidasas en la remodelación de la MEC y en procesos fibróticos (Csiszar, 2001; Kagan and Li, 2003; Lucero and Kagan, 2006; Vadasz et al., 2005), decidimos estudiar el estroma de los epidídimos de los ratones *R26*^{L2/L2}. En primer lugar, analizamos las muestras mediante la tinción con rojo sirio. Cuando se observan las preparaciones realizadas con esta técnica en microscopía de campo claro, las fibras de colágeno aparecen con un color rojo en un fondo amarillo pálido. Sin embargo, al examinar la muestra mediante luz polarizada, las fibras de colágeno más grandes muestran birrefringencia de color amarillo anaranjado, y las más pequeñas, incluyendo fibras reticulares, son de color verde (Rich L., 2005). Aunque esta técnica no permite la cuantificación del entrecruzamiento del colágeno (*crosslinking*), sí es útil para obtener información general sobre la MEC depositada. El análisis del colágeno mediante rojo sirio en los epidídimos indicó que había una mayor cantidad de fibras y con un tamaño superior en el tejido estromal de epidídimos *R26*^{L2/L2} al comparar con ratones control *R26*^{+/+} (Figura 21A). Estudios de inmunofluorescencia

confirmaron estas observaciones, permitiendo detectar un incremento en la deposición de diferentes componentes de la MEC como colágeno I, colágeno IV, elastina y fibronectina (Figura 21B). Mientras que el epidídimo de un animal silvestre mostraba una clara organización de estas proteínas en torno a la membrana basal, la señal en los ratones $R26^{L2/L2}$ era mucho más intensa y su localización no sólo estaba restringida al componente basal sino que también se extendía al estroma circundante, indicando claramente un proceso de fibrosis (Figura 21B). Adicionalmente, se detectó una redistribución de la integrina $\beta 4$ a lo largo de la membrana basal en epidídimos de ratones $R26^{L2/L2}$ frente a un patrón más difuso en animales control $R26^{+/+}$ (Figura 21B), un hecho que se ha relacionado con el fenotipo fibrótico (Margadant and Sonnenberg, 2010).

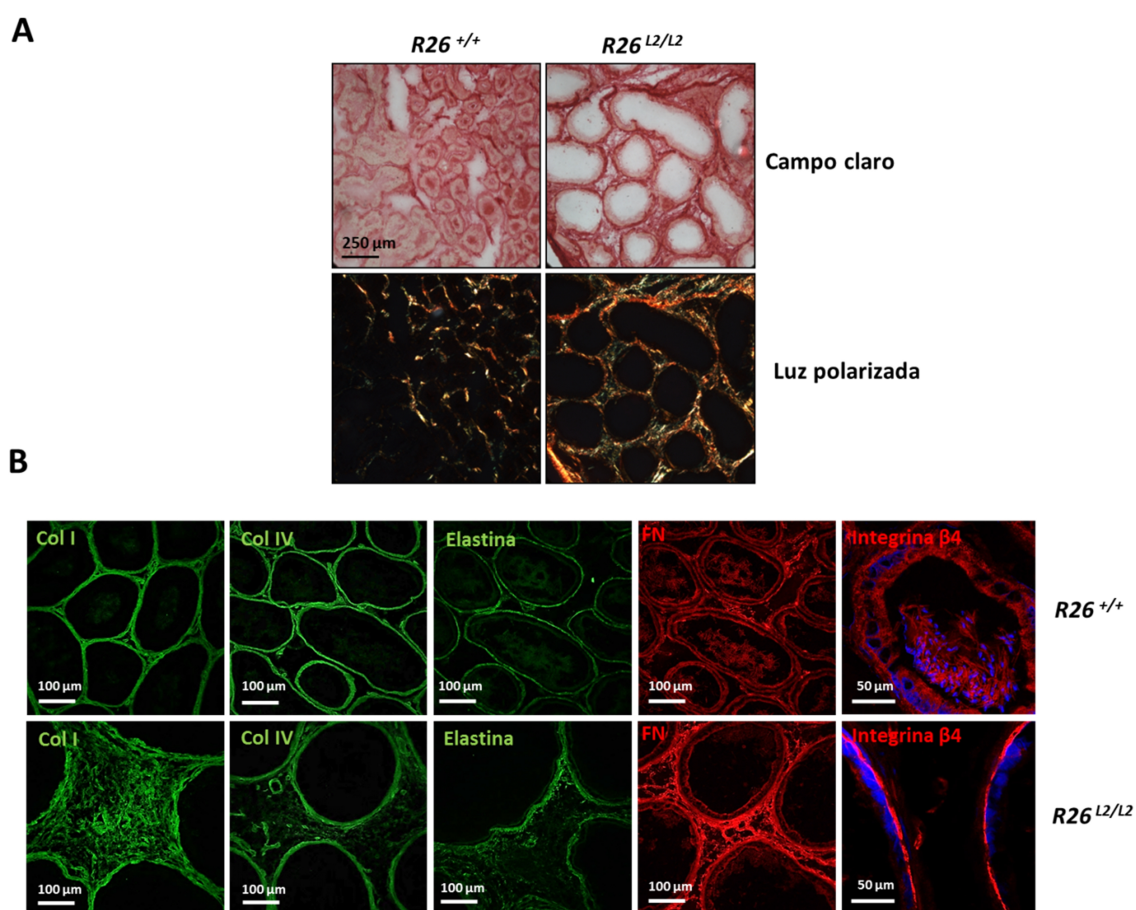


Figura 21. La sobreexpresión de *Loxl2* provoca fibrosis en el epidídimo. (A) Imágenes representativas de la tinción con rojo sirio mostrando los niveles de colágeno fibrilar en epidídimos de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ a los 3 meses de edad. En los paneles superiores se muestran imágenes tomadas en campo claro, mientras que las imágenes de los paneles inferiores representan el mismo campo observado con luz polarizada. (B) Imágenes de microscopía confocal para colágeno I (Col I), colágeno IV (Col IV), elastina, fibronectina (FN) e integrina $\beta 4$ en secciones de OCT de epidídimos de ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ de tres meses de edad.

3. ANÁLISIS DE LA AUSENCIA Y SOBREEXPRESIÓN DE LOXL2 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN (MEFs).

Con el propósito de realizar un estudio general de los posibles efectos de la ausencia y sobreexpresión de *Loxl2* a nivel molecular y celular, se obtuvieron cultivos primarios de MEFs procedentes de embriones de ratones *R26^{L2/L2}*, así como de ratones KO (*L2^{-/-}*) y sus respectivos controles.

En primer lugar, se analizó el efecto de la alteración de los niveles de *Loxl2* en las propiedades proliferativas de los MEFs. Las curvas de crecimiento realizadas mostraron que tanto la ausencia como la sobreexpresión de *Loxl2* no alteraba la proliferación de los MEFs en comparación con las células control (Figura 22A). Del mismo modo, el análisis del ciclo celular por citometría de flujo no mostró diferencias significativas en los cultivos de MEFs procedentes de los distintos genotipos (datos no mostrados). Adicionalmente, se realizó un ensayo de immortalización mediante el protocolo clásico 3T3 basado en el cultivo continuado mediante pases seriados de los tipos celulares de interés. Sin embargo, ni la ausencia ni la sobreexpresión de *Loxl2* varió significativamente la capacidad de immortalización de los MEFs (datos no mostrados). El estudio de las propiedades migratorias (mediante ensayos de cierre de herida) en ausencia o sobreexpresión de *Loxl2* tampoco arrojó diferencias destacables (datos no mostrados).

Numerosos trabajos han mostrado la implicación de LOXL2 en la TEM, mediante mecanismos dependientes e independientes de Snail1 (Herranz et al., 2012; Millanes-Romero et al., 2013; Moon et al., 2013; Moreno-Bueno et al., 2011; Peinado et al., 2005; Peinado et al., 2008). Sin embargo, el análisis de la estabilidad de Snail1 (Figura 22B) y de los niveles de expresión de factores de transcripción y marcadores relacionados con TEM (datos no mostrados) no presentó ningún cambio relevante en MEFs *L2^{-/-}* y *R26^{L2/L2}*, en comparación con sus controles correspondientes.

Con el objetivo de descartar posibles mecanismos compensatorios llevados a cabo por otros miembros de la familia lisil oxidasa, comprobamos mediante PCR semicuantitativa que su expresión en MEFs no se vio afectada por la delección o sobreexpresión de *Loxl2*, con la excepción de una ligera subida de *Loxl3* en MEFs deficientes de *Loxl2* (Figura 22C, panel derecho). Los niveles de *Loxl1* y *Loxl4* detectados en MEFs de los diferentes genotipos fueron prácticamente indetectables (datos no mostrados).

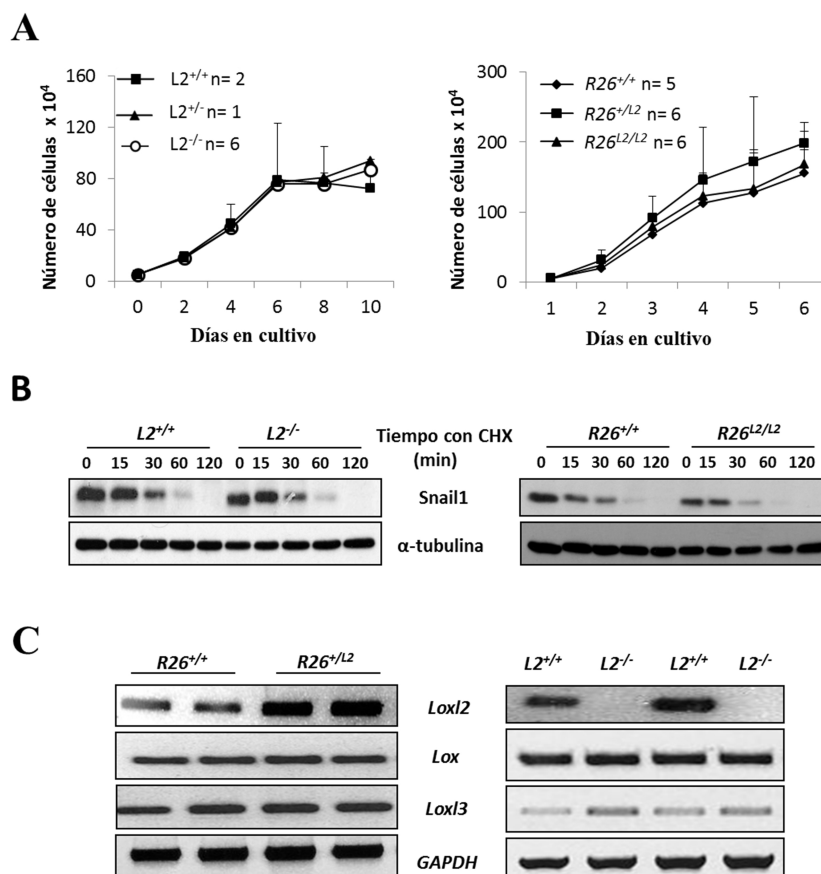


Figura 22. Análisis celular y molecular de MEFs. (A) Gráfica izquierda: curvas de crecimiento de MEFs primarios procedentes de ratones $L2^{+/+}$ (cuadrado), $L2^{+/-}$ (triángulo) y $L2^{-/-}$ (círculo). Gráfica derecha: curvas de crecimiento de MEFs primarios de ratones $R26^{+/+}$ (rombo), $R26^{+/-}$ (cuadrado) y $R26^{L2/L2}$ (triángulo). (B) Estabilidad de Snail1 en los diferentes contextos indicados para *Loxl2*. La expresión proteína Snail1 fue analizada por WB en extractos celulares de MEFs a los tiempos señalados tras el inicio del tratamiento con CHX. α -tubulina se utilizó como control de carga. (C) PCR semicuantitativa de *Loxl2*, *Lox*, y *Loxl3* en MEFs procedentes de ratones de los genotipos indicados. *GAPDH* se utilizó como control de carga.

En resumen, estos resultados indican que *Loxl2* no influye en la expresión de factores relacionados con la TEM ni en las propiedades migratorias y proliferativas de los MEFs, indicando que éste no es el sistema adecuado para estudiar la implicación de la proteína en estos procesos, y sugiriendo que su acción podría estar restringida a otros linajes celulares de mayor plasticidad biológica.

4. EFECTO DE LA DELECCIÓN Y SOBREENPRESIÓN DE *LOXL2* EN LA HOMEOSTASIS DE LA EPIDERMIS DE RATÓN.

Estudios previos de otros autores sugieren que *LOX* y *LOXL2* podrían regularse recíprocamente durante el proceso de adhesión y diferenciación terminal de queratinocitos en la epidermis humana (Fujimoto and Tajima, 2009). *LOXL2* se localiza en la capa basal de la epidermis y su expresión se ve incrementada *in vitro* en presencia de diferentes matrices extracelulares. *LOX*, sin embargo, se encuentra en las capas suprabasales y su expresión es

estimulada con agentes potenciadores de la diferenciación (Fujimoto and Tajima, 2009). Con el objetivo de entender mejor la función de Loxl2 en la homeostasis de la piel, decidimos realizar un estudio detallado de la epidermis de ratones $L2^{-/-}$ y $R26^{L2/L2}$.

4.1. Estudio de la piel de ratones neonatos $L2^{-/-}$ y $R26^{L2/L2}$.

El análisis de secciones teñidas con H&E no reveló alteraciones estructurales llamativas en la piel de ninguno de los dos modelos de expresión de Loxl2 (Figura 23). La tinción por inmunofluorescencia de componentes de uniones intercelulares, como cadherina-E, β - y γ -catenina, y claudina-1, tampoco mostró cambios relevantes en función de los niveles de Loxl2 (Figura 23). Además, el patrón del colágeno IV en la lámina basal de pieles de ratones $L2^{-/-}$ y $R26^{L2/L2}$ no cambiaba con respecto a sus controles (Figura 23). El análisis de las células basales de la epidermis mediante la detección de citoqueratina 5 (K5) no mostró ningún cambio en los ratones transgénicos (Figura 23). Sin, embargo, la expresión de diferentes marcadores de diferenciación como citoqueratina 1/10 (K1/K10) y sobretudo loricina aumentaba en ausencia de Loxl2, mientras que un efecto opuesto, menos acusado, podía detectarse en presencia de niveles suprafisiológicos de la proteína (Figura 23). Estos datos confirman *in vivo* las observaciones que involucraban a Loxl2 en la inhibición de la diferenciación epidérmica (Fujimoto and Tajima, 2009; Lugassy et al., 2012; Peinado et al., 2008).

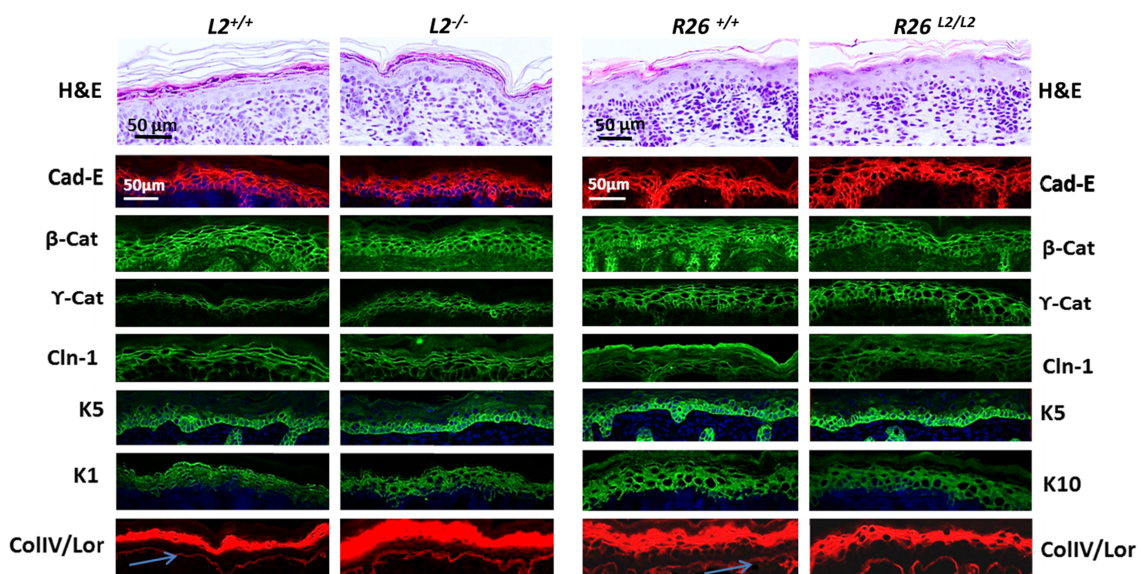


Figura 23. Análisis de la epidermis de ratones neonatos. Secciones de pieles de ratones neonatos de los genotipos indicados teñidas con H&E (paneles superiores). Imágenes de microscopía confocal para cadherina-E (Cad-E), β -catenina (β -cat), γ -catenina (γ -cat), claudina-1 (Cln-1), citoqueratina 5 (K5), citoqueratina 1 (K1)/citoqueratina 10 (K10), colágeno IV (Col IV) (flecha azul), Loricrina (Lor), en secciones de pieles embebidas en OCT de los genotipos indicados (paneles inferiores).

4.2. Cultivo y diferenciación *in vitro* de queratinocitos primarios derivados de los modelos transgénicos de *Loxl2*.

Para abordar el estudio del papel de *Loxl2* en la diferenciación epidérmica en un contexto *in vitro*, se obtuvieron cultivos primarios de queratinocitos derivados de ratones P0/P1 con genotipo *L2^{-/-}* y *R26^{L2/L2}*, así como de sus respectivos controles. Los queratinocitos aislados se sembraron sobre placas cubiertas de colágeno IV con el objetivo de recrear *in vitro* una matriz extracelular lo más parecida posible a su variante fisiológica. Ninguno de los cultivos de queratinocitos transgénicos mostraron alteradas sus propiedades de adhesión, ya que el día después de la siembra se había unido el mismo número de células a la placa con independencia del genotipo (Figura 24A). Posteriormente, los queratinocitos aislados fueron sometidos a un programa de diferenciación mediante la elevación de los niveles de calcio a 1,4 mM, sin observarse diferencias aparentes entre los genotipos en microscopía de campo claro (datos no mostrados). El análisis de marcadores de uniones intercelulares y de diferenciación a diferentes tiempos de tratamiento con calcio mostró que la expresión de la citoqueratina basal K5, como era de esperar, sufría una ligera bajada durante la diferenciación, pero sin cambios significativos entre queratinocitos de los distintos genotipos (Figura 24B). Tampoco se observaron cambios en cadherina-E y claudina-1 (Figura 24 B y C). Sin embargo, el análisis de citoqueratinas suprabasales (K1/K10) y de loricrina mostró una relación inversa entre su patrón de expresión y los niveles de *Loxl2* durante la diferenciación inducida por calcio, indicando que *Loxl2* regula negativamente *in vitro* estos componentes a lo largo del proceso de diferenciación (Figura 21 B). Una confirmación adicional de que el programa de diferenciación estaba parcialmente alterado de manera dependiente de *Loxl2* vino dada por el patrón de expresión de la lisil oxidasa prototípica (Lox) que, como se mencionó previamente, se eleva gradualmente durante el proceso de diferenciación de la epidermis (Fujimoto and Tajima, 2009). Así, mientras que los niveles de Lox tendían a aumentar durante la diferenciación de los queratinocitos control, la eliminación de *Loxl2* produjo un incremento acusado de su expresión, más evidente en ausencia de CaCl_2 , que se mantuvo sostenido durante todo el tiempo de diferenciación (Figura 24B). En contraste, los queratinocitos primarios con sobreexpresión de *Loxl2* (*R26^{L2/L2}*) mostraron unos niveles de expresión de Lox inferiores a sus respectivos controles a lo largo de todo el proceso de diferenciación (Figura 24B).

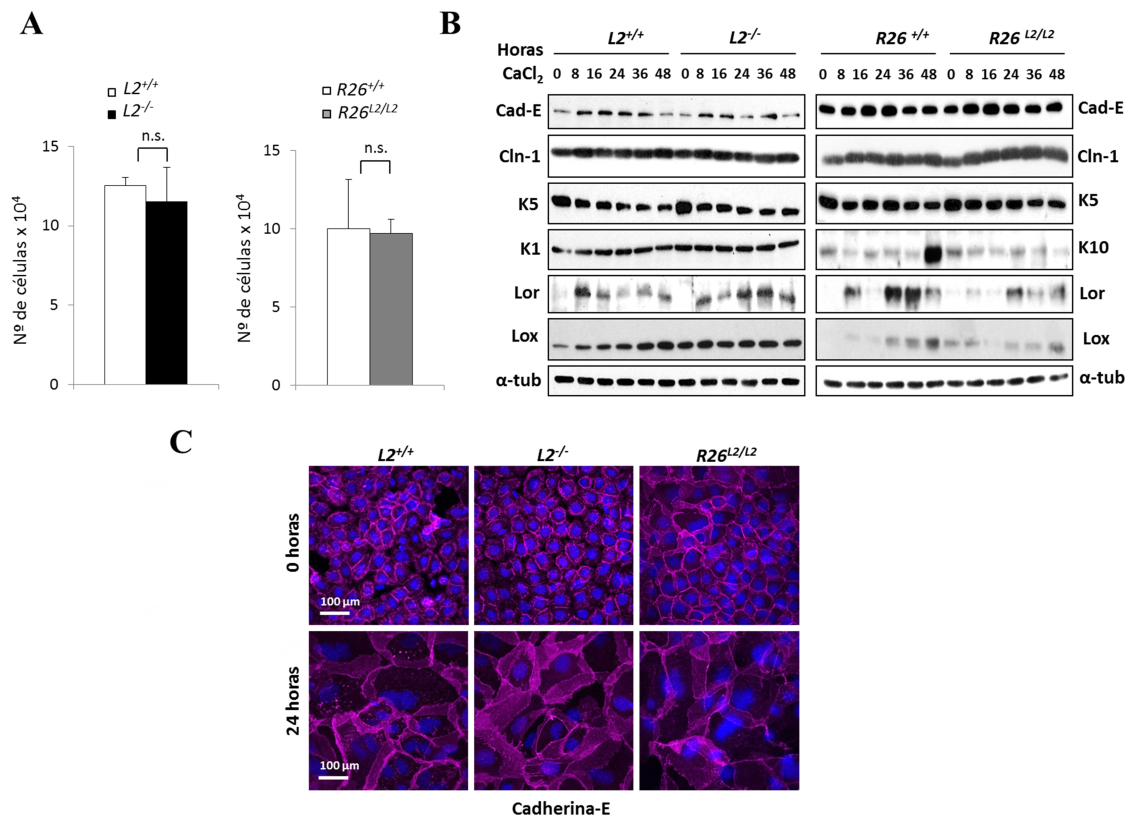


Figura 24. Cultivo y diferenciación *in vitro* de queratinocitos primarios de ratón. (A) Ensayo de adhesión a una matriz artificial de colágeno IV representado como número de células de los genotipos indicados que se adhirieron a la placa 16 h tras la siembra (n.s.= no significativo). (B) Análisis por WB de cadherina-E (Cad-E), claudina-1 (Cln-1), citoqueratina 5 (K5), citoqueratina 1 (K1)/citoqueratina 10 (K10), Loricrina (Lor) y Lox a los tiempos indicados tras la adición de $CaCl_2$. α -tubulina (α -tub) se utilizó como control de carga. (C) Imágenes de microscopía confocal de cadherina-E en queratinocitos de los genotipos indicados al inicio y 24 h después de la adición de $CaCl_2$.

Todos estos resultados permiten concluir que Loxl2 regula parcialmente la diferenciación terminal de queratinocitos de la epidermis tanto *in vivo* como *in vitro*, sin afectar a las propiedades de adhesión a la MEC.

4.3. Efecto de Loxl2 sobre la hiperplasia epidérmica inducida por TPA.

Con el objetivo de estudiar el papel de Loxl2 en la piel de ratones adultos en respuesta a un insulto mitogénico agudo, se estimuló la proliferación de las células de la epidermis con el éster de forbol TPA, que induce hiperplasia de la epidermis (Meeran et al., 2009). El análisis histológico de las pieles tratadas no mostró diferencias aparentes entre los distintos genotipos (Figura 25A, paneles superiores). Como era de esperar, la expresión de Loxl2 se encontró restringida al estrato basal de la epidermis en ratones control y no se detectó en la epidermis de ratones $L2^{-/-}$. Sin embargo, en pieles de ratones $R26^{L2/L2}$ la expresión de la proteína se extendía a todas las capas de la epidermis localizándose de manera más difusa por el citoplasma (Figura 25A, paneles inferiores). El análisis de varios marcadores de diferenciación mostró resultados similares a los obtenidos en pieles sin tratar, observándose un claro

incremento de la expresión de proteínas de diferenciación (K1, loricrina) en la epidermis de ratones $L2^{-/-}$ respecto a sus controles (Figura 25B, izquierda), mientras que un efecto inverso, menos acusado, se observó en la epidermis de ratones $R26^{L2/L2}$ (Figura 25B, derecha).

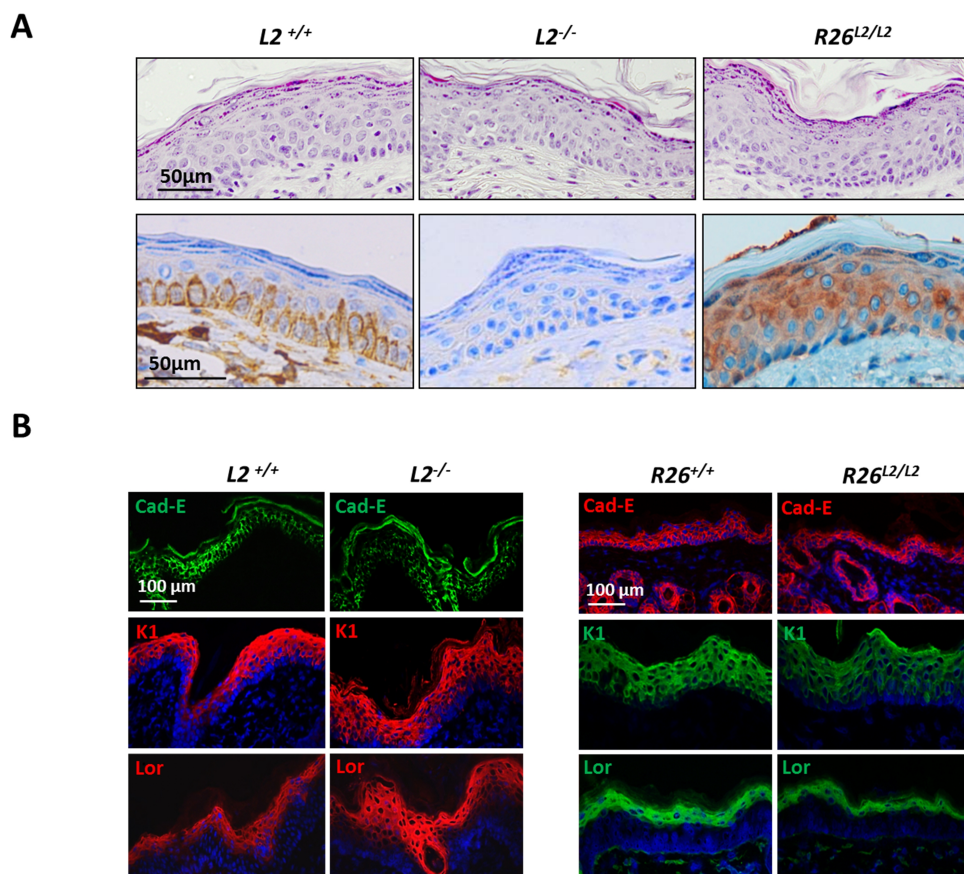


Figura 25. Análisis de pieles de ratón adulto tratadas con TPA. (A) Panel superior: tinción con H&E de pieles tratadas con TPA procedentes de animales de los genotipos indicados. Panel inferior: análisis de la expresión de Loxl2 por IHQ en pieles tratadas con TPA de ratones de los genotipos indicados. **(B)** Imágenes de microscopía confocal para cadherina-E (Cad-E), citoqueratina 1 (K1) y Loricrina (Lor) en secciones de pieles tratadas con TPA.

5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOXL2 EN LA CARCINOGENÉISIS QUÍMICA EN PIEL.

Estudios previos de nuestro grupo mostraron que LOXL2 es un marcador de mal pronóstico en carcinomas escamosos (SCC) de cabeza y cuello, uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados (Peinado et al., 2008). Con el objetivo de profundizar en el papel de Loxl2 durante la formación y progresión de carcinomas epidermoides llevamos a cabo experimentos de carcinogénesis química de piel de ratón mediante el protocolo clásico DMBA-TPA. Para ello, los ratones de los diferentes genotipos para Loxl2 fueron sometidos al tratamiento con DMBA/TPA, consistente en la aplicación tópica de una única dosis del carcinógeno dimetil-benzamida (DMBA), seguida de un tratamiento periódico de TPA durante 16 semanas (Kemp, 2005; Quintanilla et al., 1986).

5.1. Latencia y desarrollo de las lesiones durante la carcinogénesis química.

Como se puede observar en la figura 26A, los ratones *Lox12* KO comenzaron a desarrollar lesiones al mismo tiempo que los animales control ($L2^{+/+}$), es decir, a partir de las 8 semanas tras el tratamiento con DMBA (Figura 26A). Sin embargo, los ratones con sobreexpresión de *Lox12* ($R26^{L2/L2}$) mostraron una clara disminución de la latencia tumoral, apareciendo las primeras lesiones a las 5 semanas tras el comienzo del tratamiento (Figura 26B).

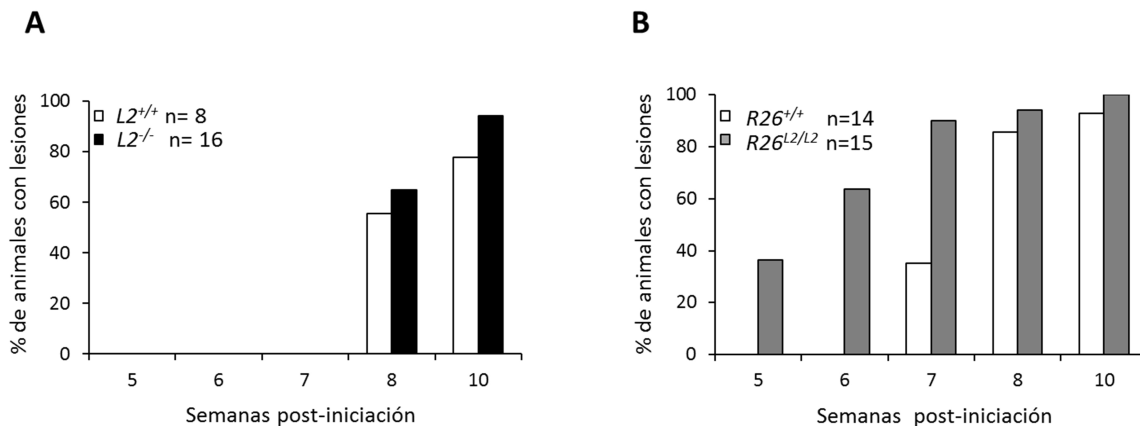


Figura 26. Latencia tumoral en la carcinogénesis de piel con DMBA/TPA. El inicio de formación de las lesiones después del tratamiento con DMBA/TPA se indica como porcentaje de ratones con lesiones para cada uno de los genotipos analizados, $L2^{+/+}$ y $L2^{-/-}$ (A) y $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$ (B), desde la semana 5 hasta la semana 10 post-iniciación. Se muestra el número de ratones (n) utilizados por cada genotipo.

El análisis macroscópico de las lesiones a lo largo de 28/30 semanas mostró que el número de neoplasias generadas por ratones $L2^{-/-}$, en comparación con los controles $L2^{+/+}$, fue ligeramente inferior (20%) durante todo el experimento (Figura 27A). En lo que se refiere al tamaño de las mismas, no se apreciaron diferencias significativas en las primeras 14 semanas tras el tratamiento con DMBA. Sin embargo, entre las 16 y 28 semanas se observaron cambios significativos entre los dos genotipos. Así, mientras que las lesiones generadas en los ratones $L2^{+/+}$ aumentaron considerablemente y de forma progresiva de tamaño, la mayoría de las lesiones detectadas en los ratones $L2^{-/-}$ apenas experimentaron crecimiento alguno, manteniéndose en dimensiones significativamente menores durante todo el ensayo. De hecho, al final del experimento (semana 28), el 50% de los tumores de ratones $L2^{+/+}$ presentaban un tamaño mayor de 6 mm de diámetro, frente al 25% en los animales KO (Figura 27A). En cuanto a los ratones $R26^{L2/L2}$, el número de lesiones, comparado con ratones $R26^{+/+}$, fue considerablemente mayor durante todo el experimento de carcinogénesis (aproximadamente el doble) (Figura 27B). En particular, a la semana 20, los ratones $R26^{L2/L2}$ tenían una media de 36 lesiones por animal, un número claramente superior a las 22 lesiones

contabilizadas en los ratones control (Figura 27B). Al contrario que en el caso de los animales KO, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las neoplasias entre ratones $R26^{L2/L2}$ y sus respectivos controles (Figura 27B).

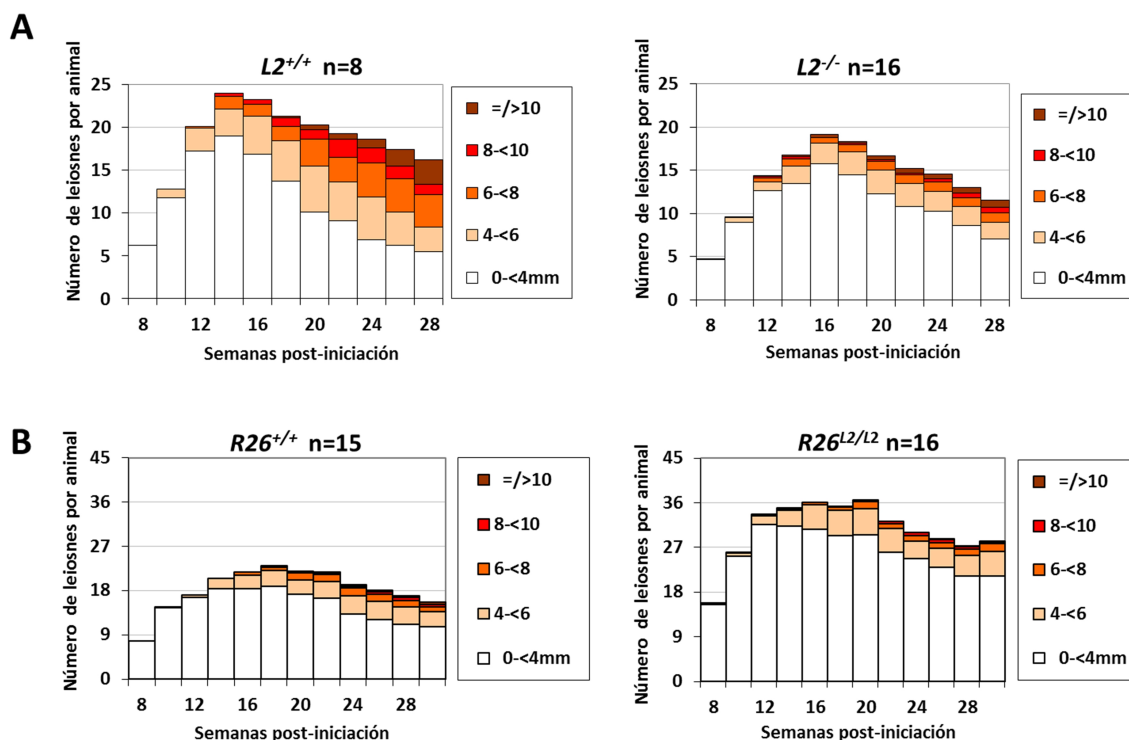


Figura 27. Número y tamaño de los tumores a lo largo del experimento con DMBA/TPA. (A) Número y tamaño de las lesiones generadas por ratón desde la semana 8 hasta la 28 después del inicio del tratamiento con DMBA en los ratones $L2^{+/+}$ y $L2^{-/-}$. (B) Número y tamaño de las lesiones generadas por ratón desde la semana 8 hasta la 30 después del inicio del tratamiento con DMBA en los ratones $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$. Se muestra el número de ratones (n) empleados por cada genotipo durante el experimento de carcinogénesis.

En conjunto, estos datos demuestran que mientras que la ausencia de *Lox12* provoca una disminución del tamaño de las lesiones en la piel, la sobreexpresión de la proteína es importante para acelerar el inicio e incrementar el número de las mismas.

5.2. Análisis histológico de las lesiones.

Los tumores recogidos al final del experimento de carcinogénesis con DMBA-TPA se sometieron a un cuidadoso análisis histológico. Aunque la mayoría de las lesiones fueron clasificadas como papilomas en todos los grupos, en el caso de las generadas en ratones $L2^{+/+}$, el 7,8% (7 de 90) progresaron a SCC, mientras que este porcentaje se redujo al 2,7% (2 de 72) en los tumores de ratones KO para *Lox12* ($L2^{-/-}$) (Figura 28A). Un comportamiento opuesto se observó cuando se estudiaron las lesiones de ratones que sobreexpresaban *Lox12* ($R26^{L2/L2}$), donde la incidencia de SCC fue de un 3,6% (4 de 110), en contraste con la completa ausencia de lesiones de este grado en los correspondientes ratones control $R26^{+/+}$ (0 de 48) (Figura

28B). Es importante destacar que las diferencias encontradas en el tamaño y el grado de progresión a SCC entre tumores de los dos grupos de animales control utilizados ($L2^{+/+}$ y $R26^{+/+}$) podrían deberse a diferencias en el fondo genético de cada una de las líneas, un factor clave en la susceptibilidad a la carcinogénesis experimental (Naito and DiGiovanni, 1989)

A continuación, analizamos la expresión de Loxl2 por IHQ en papilomas y carcinomas procedentes de ratones de todos los genotipos de interés. En el caso de los animales control, no se observaron diferencias en el patrón de expresión de Loxl2 al comparar lesiones $L2^{+/+}$ y $R26^{+/+}$ (datos no mostrados), por lo que se usaron indistintamente como controles en los estudios comparativos mostrados. La expresión de Loxl2 en papilomas control se detectó en las zonas hiperplásicas, siendo de mayor intensidad en las zonas basales más indiferenciadas, mientras que en el caso de papilomas $R26^{L2/L2}$, el patrón de expresión de la proteína, mucho más intenso, se expandió por igual a todas las capas celulares de los papilomas (Figura 28C, paneles superiores). Del mismo modo, se detectó una mayor expresión de Loxl2 en SCC procedentes de ratones $R26^{L2/L2}$ respecto a los ratones control (Figura 28C paneles inferiores). Cabe destacar que la proteína se encontraba principalmente en el compartimento intracelular de los papilomas y particularmente de los SCC (Figura 28C). La ausencia completa de Loxl2 en papilomas y SCC de ratones $L2^{-/-}$ también fue confirmada (Figura 28C, paneles centrales).

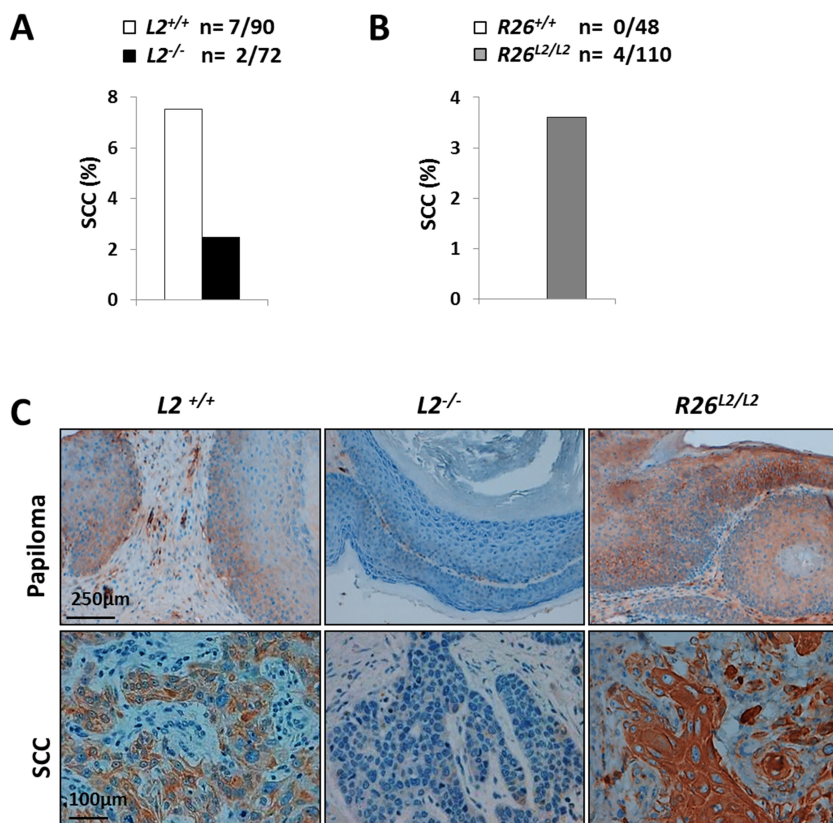


Figura 28. Análisis histológico de las lesiones inducidas por el tratamiento con DMBA/TPA. (A) Porcentaje de carcinomas escamosos (SCC) por animal en ratones $L2^{-/-}$ comparado con sus controles $L2^{+/+}$. Los valores fueron obtenidos al relativizar el número de SCC frente al número total de lesiones analizadas. **(B)** El mismo análisis es representado para los ratones $R26^{L2/L2}$ y sus respectivos controles $R26^{+/+}$. **(C)** Tinción por IHQ para Loxl2 en papilomas y SCC de ratones control ($L2^{+/+}$), KO ($L2^{-/-}$) y de sobreexpresión de Loxl2 ($R26^{L2/L2}$).

5.3. Papel de Loxl2 en la diferenciación de papilomas y la regulación de la ruta de Notch.

En trabajos anteriores, LOXL2 fue propuesta como regulador negativo de la diferenciación de carcinomas escamosos humanos (Peinado et al., 2008). Los resultados obtenidos en los modelos transgénicos, en términos de progresión a SCC, nos llevaron a estudiar la implicación potencial de Loxl2 en el programa de diferenciación de estos tumores. La menor malignización observada en los papilomas derivados de ratones $L2^{-/-}$ se correlacionó con un marcado incremento de la diferenciación, tal y como muestran las mediciones por PCR cuantitativa de distintos marcadores de diferenciación. La expresión de genes como *citoqueratina 1* (*K1*), *loricrina* e *involucrina* aumentó hasta casi cuatro veces en papilomas carentes de Loxl2 (Figura 29A). Significativamente, la expresión de *Lox*, relacionada previamente con el proceso de queratinización de la epidermis (Fujimoto and Tajima, 2009), se incrementó más de cien veces en las lesiones procedentes de ratones $L2^{-/-}$ (Figura 29A). Esta observación, además de confirmar una alteración en el programa de diferenciación, sugiere la existencia de un mecanismo de regulación recíproco entre ambas proteínas en el contexto *in vivo* de progresión tumoral. El análisis de los otros miembros de la familia lisil oxidasa mostró que *Loxl3* también aumentó su expresión en los papilomas en ausencia de Loxl2 (aunque de un modo mucho más sutil), mientras que la expresión de *Lox1* y *Loxl4* no se vio afectada respecto a las lesiones control (Figura 29B). El estudio de las lesiones generadas en ratones $R26^{L2/L2}$ reveló un patrón inverso, con una reducción de algunos marcadores de diferenciación. Así, los niveles de *K1*, *loricrina* y especialmente *involucrina* mostraban una clara tendencia descendente en respuesta al incremento de Loxl2 (Figura 29C). Al igual que en el caso de las lesiones $L2^{-/-}$ la expresión de *Loxl1* se mantenía invariable, mientras que los niveles de mRNA de *Lox*, *Loxl3* y *Loxl4* disminuyeron significativamente en papilomas de ratones $R26^{L2/L2}$ en comparación con sus controles (Figura 29C y D), reforzando la hipótesis de una posible conexión transcripcional entre los cuatro miembros de la familia.

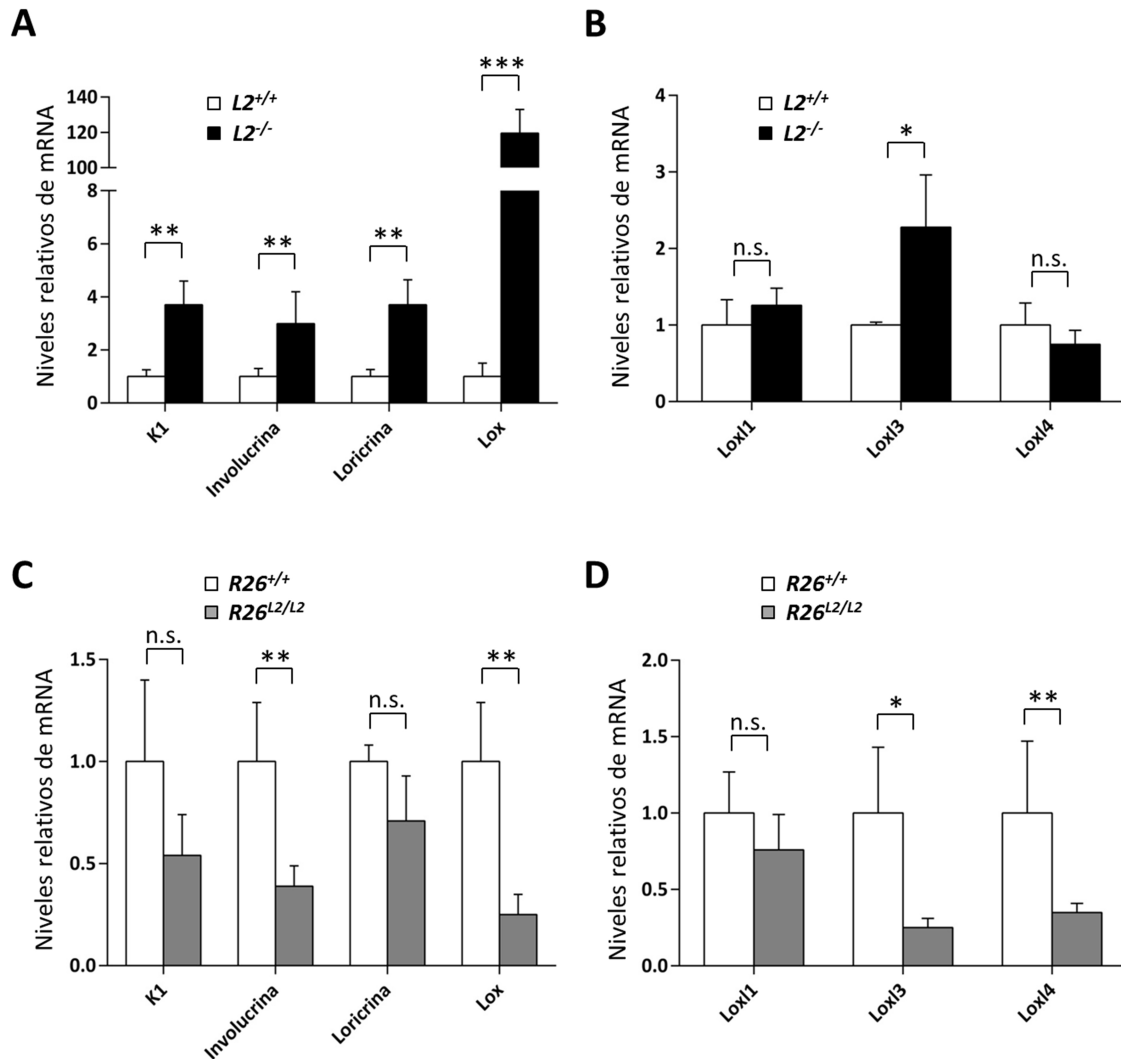
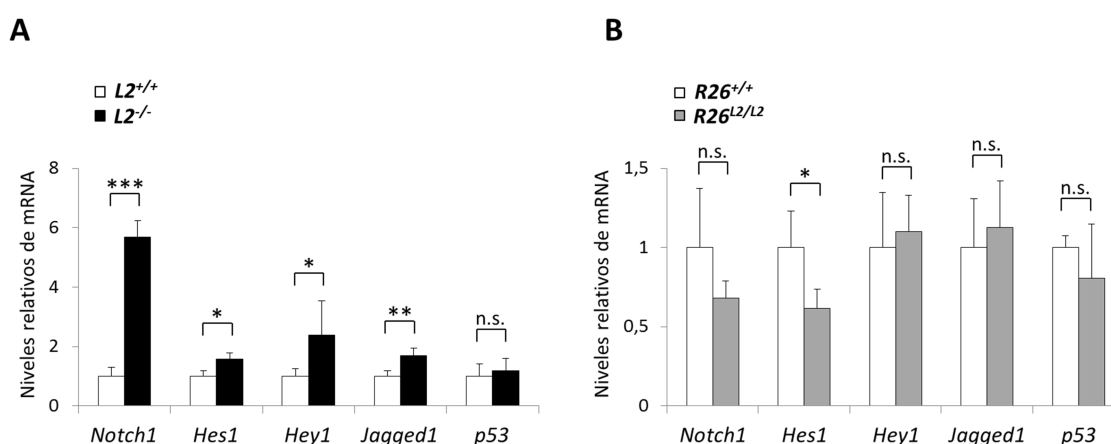


Figura 29. Influencia de *Loxl2* en la diferenciación de papilomas. (A) Análisis por PCR cuantitativa de marcadores de diferenciación epidérmica (*K1*= *cioqueratina 1*, *involucrina*, *loricrina*, y *Lox*) en papilomas $L2^{+/+}$ y $L2^{-/-}$. (B) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *Loxl1*, *Loxl3* y *Loxl4* en papilomas $L2^{+/+}$ y $L2^{-/-}$. (C, D) El mismo análisis que en (A, B) fue llevado a cabo en papilomas $R26^{+/+}$ y $R26^{L2/L2}$. Se utilizaron al menos 4-5 grupos de papilomas ("pool"), con al menos 3 papilomas por pool para cada uno de los genotipos analizados. Los resultados muestran la media de, al menos, dos experimentos independientes. Barras, error estándar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; n.s.= no significativo estadísticamente.

Estudios previos de otros grupos demostraron la implicación de la vía de señalización de Notch en la homeostasis de la epidermis, contribuyendo al mantenimiento de la diferenciación, y al control celular de la proliferación y la apoptosis (Guinea-Viniegra et al., 2012; Lefort and Dotto, 2004; Panelos and Massi, 2009; Watt et al., 2008). Asimismo, la vía de Notch se ha descrito como supresor tumoral en cáncer de piel de tipo no-melanoma (Lefort and Dotto, 2004; Lefort et al., 2007; Watt et al., 2008). En base a estos antecedentes, planteamos la hipótesis de que *Loxl2* podría estar afectando a la regulación de esta vía durante la carcinogénesis de piel de ratón. Para ello, analizamos, mediante PCR cuantitativa, la expresión de algunos genes implicados en la vía canónica de Notch como *Notch1*, su ligando

Jagged1 o las dianas *Hes1* y *Hey1*. En ausencia de *Loxl2*, los papilomas mostraron un incremento de los niveles de mRNA de *Notch1*, junto con una inducción concomitante de *Hes1* y *Hey1*, así como un aumento en la expresión de *Jagged1* (Figura 30A). Sin embargo, no hubo cambios significativos en los niveles de expresión de *p53* (Figura 30A), implicado en la inducción transcripcional de *Notch1* en piel (Guinea-Viniegra et al., 2012; Lefort et al., 2007; Yugawa et al., 2007). El mismo tipo de análisis en papilomas derivados de ratones *R26^{L2/L2}* y sus controles mostró que la expresión de *Notch1* y *Hes1* se vio inhibida, aunque en niveles moderados, respecto a papilomas *R26^{+/+}*, mientras que los transcritos de *Hey1*, *Jagged* y *p53* no



cambiaron entre papilomas de los dos genotipos (Figura 30B).

Figura 30. Influencia de *Loxl2* en la regulación de la ruta de Notch. (A) Análisis por PCR cuantitativa de *Notch1*, *Hes1*, *Hey1*, *Jagged1* y *p53* en papilomas *L2^{+/+}* y *L2^{-/-}*. (B) El mismo análisis que en (A) fue llevado a cabo en papilomas *R26^{+/+}* y *R26^{L2/L2}*. Se utilizaron al menos 4-5 grupos de papilomas ("pool"), con al menos 3 papilomas por pool para cada uno de los genotipos analizados. Los resultados muestran la media de, al menos, dos experimentos independientes. Barras, error estándar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; n.s.= no significativo estadísticamente.

En resumen, los datos obtenidos durante la carcinogénesis química apoyan un papel relevante de *Loxl2* en la iniciación y progresión de estos tumores de piel por su capacidad de bloquear la diferenciación, mediada, al menos en parte, por la inhibición de la ruta de Notch.

6. PAPEL DE LOXL2 EN CARCINOMAS DE MAMA EN EL MODELO TUMORAL *PyMT*.

En los últimos años, diversos trabajos indican la existencia de una relación directa entre LOXL2 y la migración de células en diferentes modelos de cáncer de mama (Barker et al., 2011; Hollosi et al., 2009; Moreno-Bueno et al., 2011), así como con la agresividad de estos carcinomas (Barker et al., 2011; Barry-Hamilton et al., 2010; Moreno-Bueno et al., 2011). Concretamente, nuestro grupo demostró que los altos niveles intracelulares de LOXL2 se asocian con la metástasis a distancia de carcinomas basales de mama (Moreno-Bueno et al., 2011). Con la intención de profundizar en las funciones de LOXL2 durante la progresión del cáncer de mama, combinamos los ratones genéticamente modificados para *Loxl2*, con el modelo tumoral “*Polyoma middle T*” (*PyMT*).

El modelo de ratón transgénico *PyMT* desarrolla adenocarcinomas de mama altamente agresivos capaces de producir metástasis en pulmón con una frecuencia muy elevada (Lin et al., 2003). En este modelo, la expresión del oncogén “*polyoma middle T antigen*” está sujeto al control por el promotor del virus MMTV (“*Mouse mammary tumor virus*”) y, por tanto, quedando su expresión restringida al epitelio mamario (Guy et al., 1992). El desarrollo de estos tumores es comparable con la progresión, a nivel histológico y molecular, de tumores de mama humanos, ya que se pueden distinguir las diferentes etapas que van desde una lesión premaligna (*in situ*) a un carcinoma altamente invasivo (Lin et al., 2003). Con el objetivo de estudiar de una manera más fisiológica las funciones de *Loxl2* en la progresión de los tumores de mama, decidimos combinar el modelo *PyMT* con los modelos condicionales de delección y sobreexpresión de *Loxl2* descritos en los apartados previos. Para ello, en primer lugar, las distintas cepas transgénicas condicionales para *Loxl2* se combinaron con la línea de ratón genéticamente modificada *MMTV-Cre* (Figura 31A), de modo que la presencia de la recombinasa Cre quedaba circunscrita al epitelio de la glándula mamaria (Wagner et al., 2001), permitiendo así que *Loxl2* resultara delecionada/sobreexpresada en este contexto específico. Estas nuevas líneas se cruzaron a su vez con la cepa *PyMT* para finalmente generar los modelos tumorales de mama tanto de pérdida como de ganancia de función de *Loxl2*, respectivamente designados como *PyMT^{+/-};MMTV-Cre^{+/-};L2^{fl/-}* (al que nos referiremos como *PyMT;L2^{Δ/-}*) y *PyMT^{+/-};MMTV-Cre^{+/-};R26^{STOPL2/STOPL2}* (simplificado como *PyMT;R26^{L2}*) (Figuras 11 y 31). El estudio de ambas líneas transgénicas se hizo en comparación con sus correspondientes controles que no expresaban la proteína Cre: *PyMT^{+/-};MMTV-Cre^{+/-};L2^{fl/fl}* (*PyMT;L2^{fl/fl}*) para la línea KO de *Loxl2* y *PyMT^{+/-};MMTV-Cre^{+/-};R26^{STOPL2/STOPL2}* (*PyMT;R26^{STOPL2}*) para la de sobreexpresión de *Loxl2* (Figura 31).

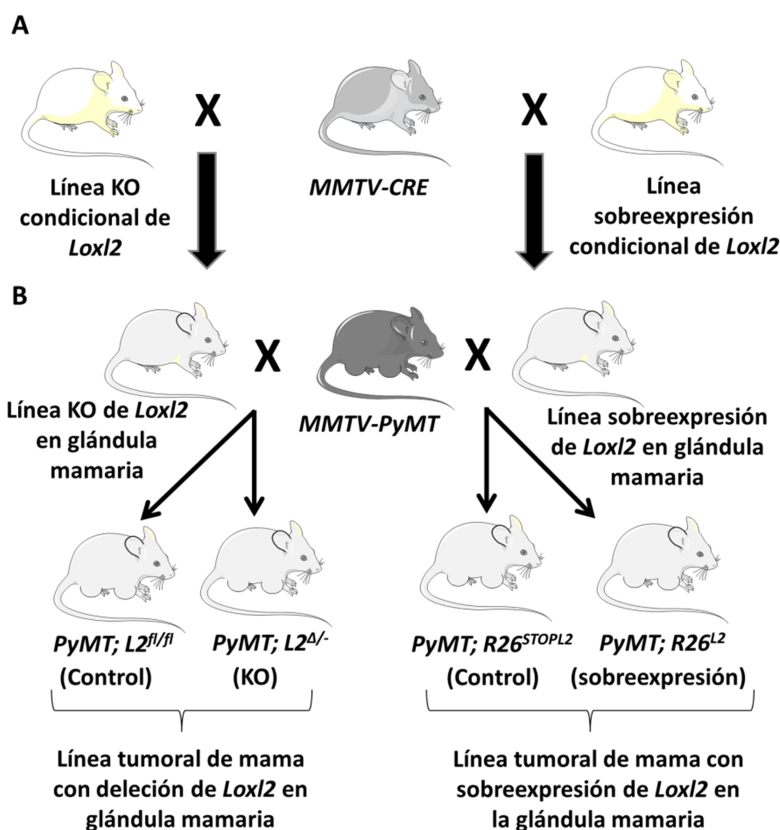


Figura 31. Esquema de los cruces de ratón necesarios para el estudio del papel *Loxl2* durante la carcinogénesis mamaria en el modelo *PyMT*. (A) Los ratones condicionales de pérdida y ganancia de función de *Loxl2* se cruzaron con la cepa *MMTV-Cre* dando lugar a las líneas de ratón condicionales de deletión y sobreexpresión de *Loxl2* en la glándula mamaria. **(B)** Estos ratones fueron cruzados, a su vez, con la línea *MMTV-PyMT* para generar los modelos tumorales de deletión (*PyMT;L2^{Δ/Δ}*) y sobreexpresión (*PyMT;R26^{L2}*) de *Loxl2*, específicos en la glándula mamaria, así como sus controles sin *Cre* *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;R26^{STOPL2}*, respectivamente (ver también materiales y métodos para más información sobre los cruces).

6.1. Implicación de *Loxl2* en la progresión tumoral y la metástasis pulmonar.

Tanto los ratones *PyMT;L2^{Δ/Δ}* como sus controles *PyMT;L2^{fl/fl}* comenzaron a desarrollar lesiones palpables en las glándulas mamarias en torno a las 10-12 semanas de edad. El tamaño y número de los tumores se monitorizó hasta la semana 16, cuando los animales fueron sacrificados. No se encontraron diferencias en estos parámetros cuando se compararon los dos grupos de animales (datos no mostrados). Sin embargo, el análisis histológico de las lesiones reveló que aunque todas se diagnosticaron como adenocarcinomas invasivos, el 70% de los tumores provenientes de ratones *PyMT;L2^{Δ/Δ}* (13 de 18) contenían áreas de carcinoma *in situ* (estructuras de “comedo”), con unos bordes bien definidos y sin componente invasivo. En cambio, este porcentaje se redujo al 25% (3 de 12) en el caso de los tumores desarrollados por ratones control *PyMT;L2^{fl/fl}* (Figura 32A y B). Aunque la falta de anticuerpos capaces de reconocer eficientemente la proteína *Loxl2* murina en este sistema nos impidió detectar la expresión de *Loxl2* tanto por IHQ como por WB, el análisis por PCR semicuantitativa en tumores primarios de ratones *PyMT;L2^{Δ/Δ}* reveló, como cabía esperar, niveles de *Loxl2* significativamente menores al compararlos con los encontrados en las lesiones *PyMT;L2^{fl/fl}* (Figura 32C). Como queda patente, la expresión de *Loxl2* en los tumores KO no desaparecía completamente, probablemente debido al estroma presente en estas neoplasias, donde la recombinasa *Cre*, sujeta al control del promotor epitelial *MMTV*, no mediaría ningún evento

de recombinación. El estudio de la expresión a nivel de mRNA de los otros miembros de la familia lisil oxidasa mostró únicamente un ligero incremento en la expresión de *Lox* prototípica, probablemente como parte de un mecanismo compensatorio o de regulación cruzada entre ambas (Figura 32D).

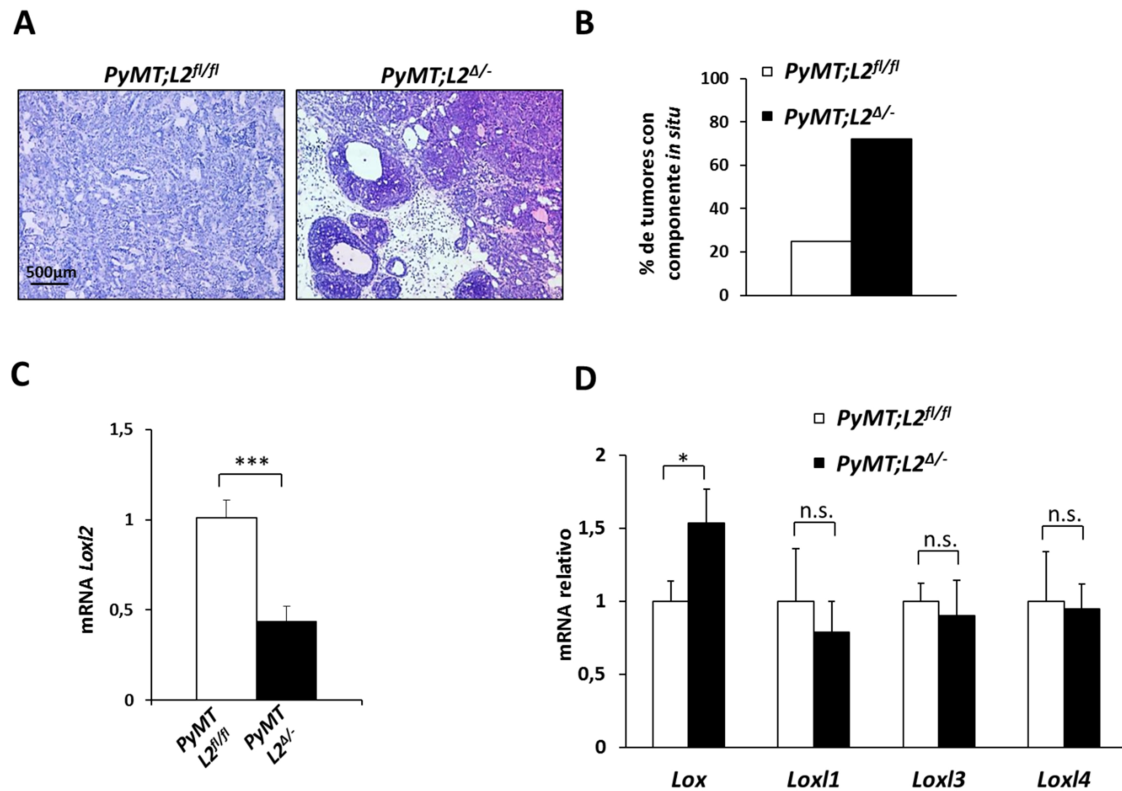


Figura 32. Análisis de los tumores primarios de mama del modelo de delección de *Loxl2*. (A) Análisis histológico de tumores embebidos en parafina, procedentes de ratonas *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;L2^{Δ/Δ}* de 16 semanas de edad. (B) Representación del porcentaje de tumores con componente *in situ* en el tumor primario en ratones de los dos genotipos indicados. (C) Cuantificación (relativizada a los niveles de *GAPDH*) de PCR semicuantitativa de *Loxl2* en tumores procedentes de ratones *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;L2^{Δ/Δ}* de 16 semanas de edad. (D) PCR cuantitativa del resto de miembros de la familia lisil oxidasa (*Lox*, *Loxl1*, *Loxl3* y *Loxl4*) en tumores de ratones *PyMT;L2^{Δ/Δ}* de 16 semanas de edad comparado con sus respectivos controles. Se utilizaron, al menos, 4 tumores de cada genotipo. Barras, error estándar; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; n.s.= no estadísticamente significativo.

A continuación, procedimos a examinar la influencia de *Loxl2* en el desarrollo de metástasis pulmonares en ratones de 16 semanas de edad. En comparación con los controles, los animales *PyMT;L2^{Δ/Δ}* mostraron un 75% menos de carga metastásica y, llamativamente, un menor número de macrometástasis (Figura 33A y B). De hecho, mientras que en los ratones *PyMT;L2^{fl/fl}* un 7,5% de metástasis mostraba un tamaño superior a 0,5 mm, en los animales *PyMT;L2^{Δ/Δ}* este porcentaje disminuyó al 5%, indicando la potencial implicación de *Loxl2* en la colonización del parénquima pulmonar (Figura 33A y B).

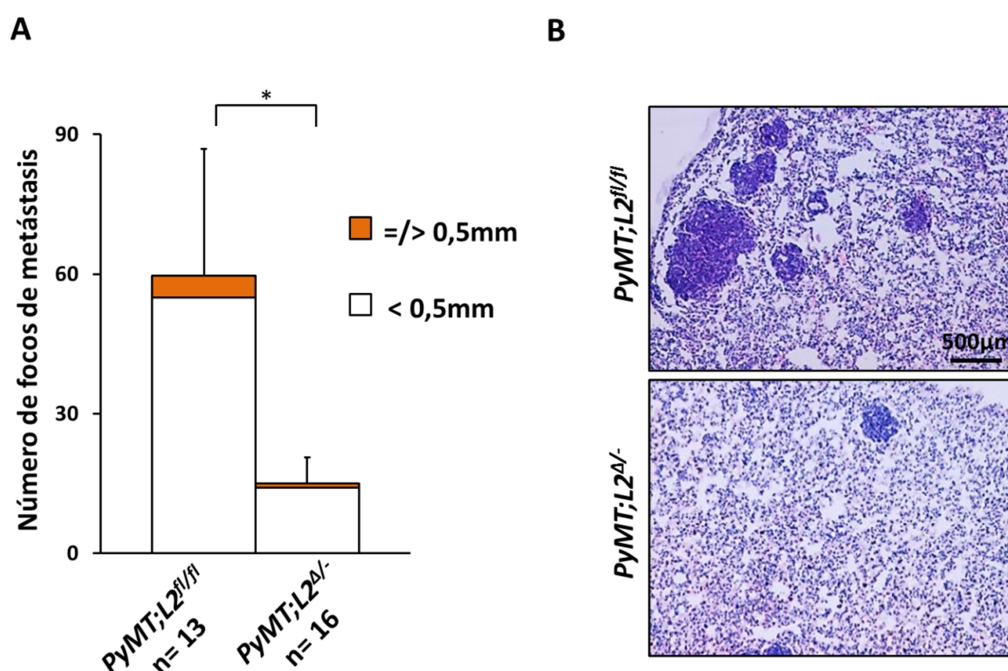


Figura 33. Estudio de la carga metastásica pulmonar en ratonas de la línea tumoral de delección de *Loxl2*. (A) Media del número y tamaño de los focos metastásicos en animales de 16 semanas control *PyMT;L2^{fl/fl}* y KO *PyMT;L2^{Δ/Δ}*. El número de animales analizado (n) fue de 13 en el grupo control y 16 en la línea KO. Barras, error estándar; * $p < 0,05$. (B) Imagen representativa (H&E) de pulmones metastásicos de los dos grupos de animales.

En lo que se refiere a los ratones *PyMT;R26^{L2}*, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la latencia, número y tamaño de las lesiones primarias con respecto a los animales control *PyMT;R26^{STOP^{L2}}* (datos no mostrados). Los dos grupos desarrollaron neoplasias histológicamente similares a las 16 semanas de edad, clasificadas todas como adenocarcinomas invasivos, sin observarse componente *in situ* en ninguno de los tumores analizados (Figura 34A). Como era de esperar, se detectó un claro incremento de la expresión de *Loxl2* por PCR semicuantitativa en los tumores de ratones *PyMT;R26^{L2}* respecto a los controles (Figura 34B). Además, de acuerdo con la estrategia seguida para la generación de esta línea, pudimos comprobar mediante análisis por fluorescencia la expresión de GFP, y consecuentemente del transgén, restringida a las células tumorales y a los focos de metástasis pulmonar (Figura 34C). No se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión del resto de miembros de la familia lisil oxidasa entre los distintos genotipos analizados (Figura 34D).

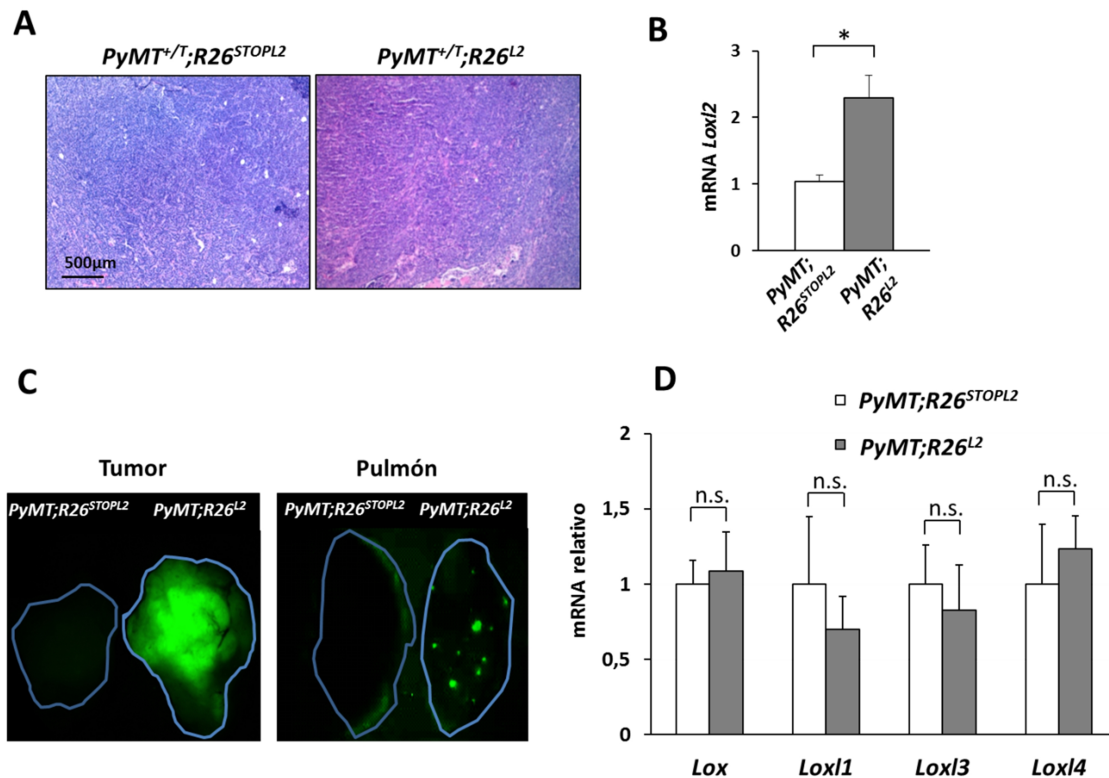


Figura 34. Análisis de los tumores primarios de mama del modelo de sobreexpresión de *Loxl2*. (A) Análisis histológico (H&E) de tumores embebidos en parafina, procedentes de ratones *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}* de 16 semanas de edad. (B) Cuantificación (relativizada a los niveles de *GAPDH*) de PCR semicuantitativa de *Loxl2* en tumores procedentes de ratones *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}* de 16 semanas de edad. (C) Imágenes de GFP, obtenidas a través de una lupa de fluorescencia, de tumores y pulmones de animales control *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}*. (D) PCR cuantitativa del resto de miembros de la familia *lisil oxidasa* (*Lox*, *Loxl1*, *Loxl3* y *Loxl4*) en tumores procedentes de ratones *PyMT;R26^{L2}* de 16 semanas de edad comparado con sus respectivos controles *PyMT;R26^{STOPL2}*. Se utilizaron, al menos, 4 tumores de cada genotipo. Barras, error estándar; * $p < 0,05$; n.s.= no estadísticamente significativo.

El examen de las lesiones metastásicas a las 16 semanas de edad mostró un claro incremento de la carga metastásica en los pulmones de ratones *PyMT;R26^{L2}* en comparación con los animales *PyMT;R26^{STOPL2}*. De hecho, mientras que en ratones control el número medio de focos metastásicos por animal era de 10, este número se elevó a una media de 25 lesiones en los pulmones de los ratones que sobreexpresaban *Loxl2* (Figura 35A y B). Por último, cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en relación al tamaño de las lesiones (Figura 35A y B).

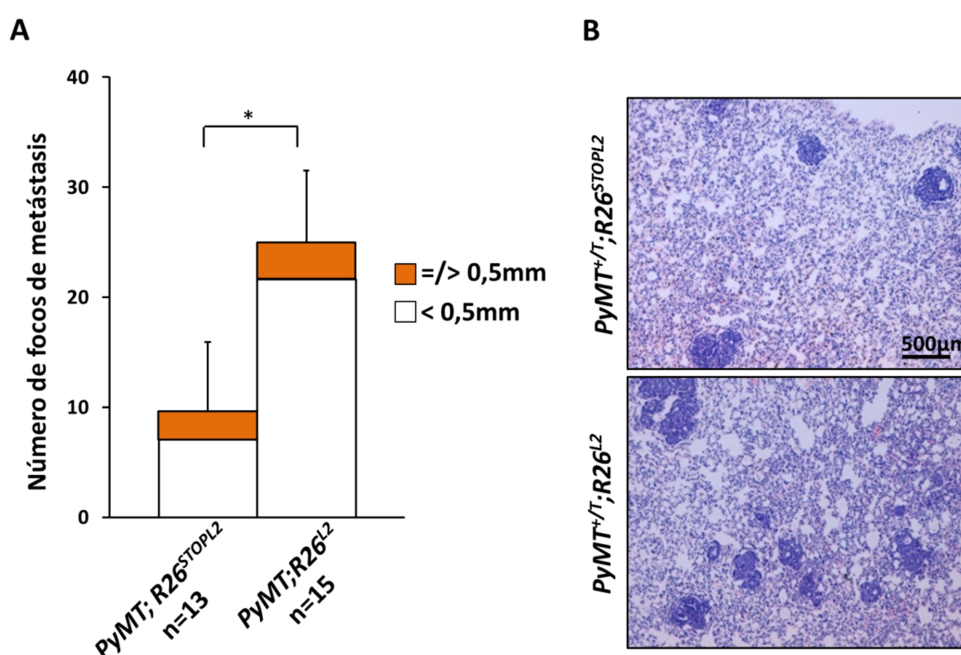


Figura 35. Estudio de la carga metastásica pulmonar en ratonas de la línea tumoral de sobreexpresión de *Loxl2*. **(A)** Media del número y tamaño de los focos metastásicos en animales *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}* de 16 semanas. El número de animales analizado (n) fue de 13 en el grupo control y 15 en la línea de sobreexpresión. Barras, error estándar; * $p < 0,05$. **(B)** Imagen representativa (H&E) de pulmones metastásicos de los dos grupos de animales.

En conjunto, todos estos resultados vinculan de manera directa la expresión de *Loxl2* con la agresividad tumoral y la metástasis pulmonar de carcinomas de mama.

6.2. Estudio del papel de *Loxl2* en la formación del nicho pre-metastásico.

Durante los últimos años, varios estudios han implicado a diferentes miembros de la familia lisil oxidasa en la formación del nicho pre-metastásico (Canesin et al., 2014; Erler et al., 2006; Wong et al., 2011). Estos trabajos demuestran, mediante sistemas basados en modelos celulares y de *xenograft*, cómo algunos miembros de la familia LOX, entre ellos LOXL2, ayudarían al reclutamiento de poblaciones de BMDCs en el parénquima pulmonar, que en última instancia favorecerían la llegada y el crecimiento de las células tumorales (Psaila and Lyden, 2009).

6.2.1. Papel de *Loxl2* en el reclutamiento de poblaciones celulares de la médula ósea.

Para intentar comprender si el mecanismo responsable de la reducción/aumento de la metástasis en los modelos de delección y sobreexpresión de *Loxl2* en el contexto *PyMT* estaba relacionado con la movilización y reclutamiento de BMDCs, centramos nuestra atención en las células progenitoras mieloides doble positivas para los marcadores CD11b+/Gr1+. A esta

población se le ha conferido un papel muy activo durante la formación del nicho pre-metastásico (Sceneay et al., 2012; Ye et al., 2010). Para ello, decidimos recoger muestras de animales de 14 semanas de edad, cuando el desarrollo de los tumores ya era notable, pero la incidencia metastásica todavía era muy baja. Tras el sacrificio de los ratones y el procesamiento de las muestras, analizamos por citometría de flujo las poblaciones de células mieloides CD11b+/Gr1+ positivas en la médula ósea, sangre y pulmones.

Como cabía esperar, el desarrollo de lesiones tumorales elevaba el porcentaje de precursores mieloides en los tres compartimentos analizados, especialmente en sangre y pulmón, en relación a los valores encontrados en animales libres de tumores (Figura 36A y B). Si bien, el incremento era más moderado en ausencia de *Loxl2* (Figura 36A) y mucho más acusado en respuesta a su sobreexpresión (Figura 36B). Así, en los animales *PyMT;L2^{Δ/-}* los valores de la población mieloides CD11b+/Gr1+ pasaron a reducirse un 20% en el caso de la sangre y la médula y alrededor de un 40% en los pulmones (Figura 36A), con respecto a los animales control con tumores. Por el contrario, en ratonas *PyMT;R26^{L2}* la población CD11b+/Gr1+ mostró un incremento significativo del 17% en médula ósea, 39% en sangre y 57% en pulmón en relación a los animales control con tumores (Figura 36B).

En resumen, todos estos datos indican la existencia de un papel activo de *Loxl2* en la movilización de las células mieloides inmaduras CD11b+/Gr1+ y su reclutamiento al tejido pulmonar.

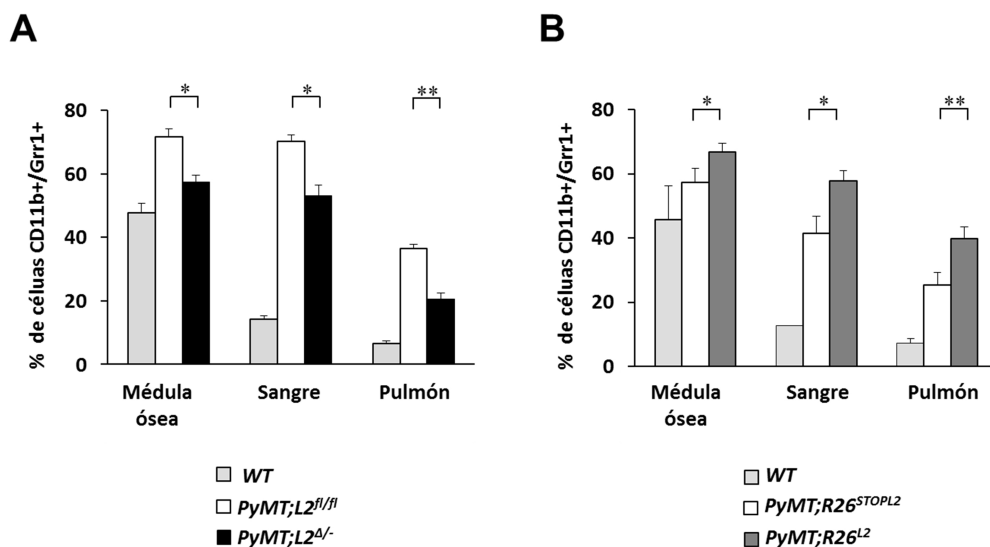


Figura 36. Movilización y reclutamiento en el pulmón de BMDs. (A) Análisis, mediante citometría de flujo, del contenido de células CD11b+/Gr1+ en médula ósea, sangre y pulmón de ratonas silvestres (WT), y en los modelos *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;L2^{Δ/-}* a las 14 semanas de edad. Se analizaron 7 pools de dos ratonas por tejido para los modelos transgénicos y sus respectivos controles, y 2 pools para los animales WT. **(B)** Se llevó a cabo el mismo tipo de análisis en los modelos *PyMT;R26^{STOPL2}* (n= 6 ratones) y *PyMT;R26^{L2}* (n= 8 ratones), en paralelo con 2 pools de ratonas WT. Barras, error estándar; *p<0,05, **p<0,01.

6.2.2. Papel de *Loxl2* en la regulación de la expresión de factores implicados en el nicho pre-metastásico.

Diferentes citoquinas y factores de crecimiento producidos tanto por el tumor primario como por los órganos diana, juegan un papel crítico durante la formación del nicho pre-metastásico y la metástasis temprana (Hiratsuka et al., 2006; Psaila and Lyden, 2009; Spano and Zollo, 2012). Para analizar la implicación de *Loxl2* en la modulación de estos factores, decidimos analizar la expresión de los mismos en los modelos de cáncer de mama de delección y sobreexpresión de *Loxl2*, mediante PCR cuantitativa, tanto en tumores primarios como en pulmones de animales de 14 semanas, que presentaban un muy incipiente desarrollo metastásico.

La deficiencia de *Loxl2* indujo una fuerte bajada, tanto en lesiones primarias como en pulmones, en la expresión de las quimioquinas *S100A8* y *S100A9* (Figura 37A), implicadas en el reclutamiento de BMDCs por parte de los órganos diana de las metástasis (Hiratsuka et al., 2006; Rafii and Lyden, 2006). De una manera menos acusada, pero significativa, se detectó una disminución de la expresión del factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (*GM-CSF*) en ambos compartimentos (Figura 37A). Por otra parte, la reducción de los niveles de otros factores como *TNF α* y *VEGF* en los ratones *PyMT;L2^{Δ/-}* se restringió al tumor primario (Figura 37A). Finalmente, extendimos nuestro análisis a moléculas depositadas en la MEC y a las que se les ha asignado un papel importante en la metástasis, como son tenascina-C (*TEN-C*) y fibronectina (Erler et al., 2006; Oskarsson et al., 2011). Sin embargo, no encontramos cambios significativos al comparar su expresión en animales *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;L2^{Δ/-}* (datos no mostrados). Un análisis similar en los tumores primarios y pulmones de ratones de sobreexpresión de *Loxl2* *PyMT;R26^{L2}* mostró un incremento acusado de las quimioquinas *S100A8* y *S100A9* tanto en los tumores primarios como en los pulmones (Figura 37B). Sorprendentemente, los niveles de *TNF α* , *GM-CSF* y *VEGF* no se vieron afectados en ninguno de los dos tejidos analizados en respuesta al incremento de la expresión de *Loxl2* (Figura 37B y datos no mostrados). Por último, la expresión de *TEN-C* y *fibronectina* se incrementó notablemente en los pulmones de ratones *PyMT;R26^{L2}* respecto a sus controles (Figura 37B). Este incremento se pudo confirmar también mediante análisis por IF en el caso de la *TEN-C* (Figura 37C).

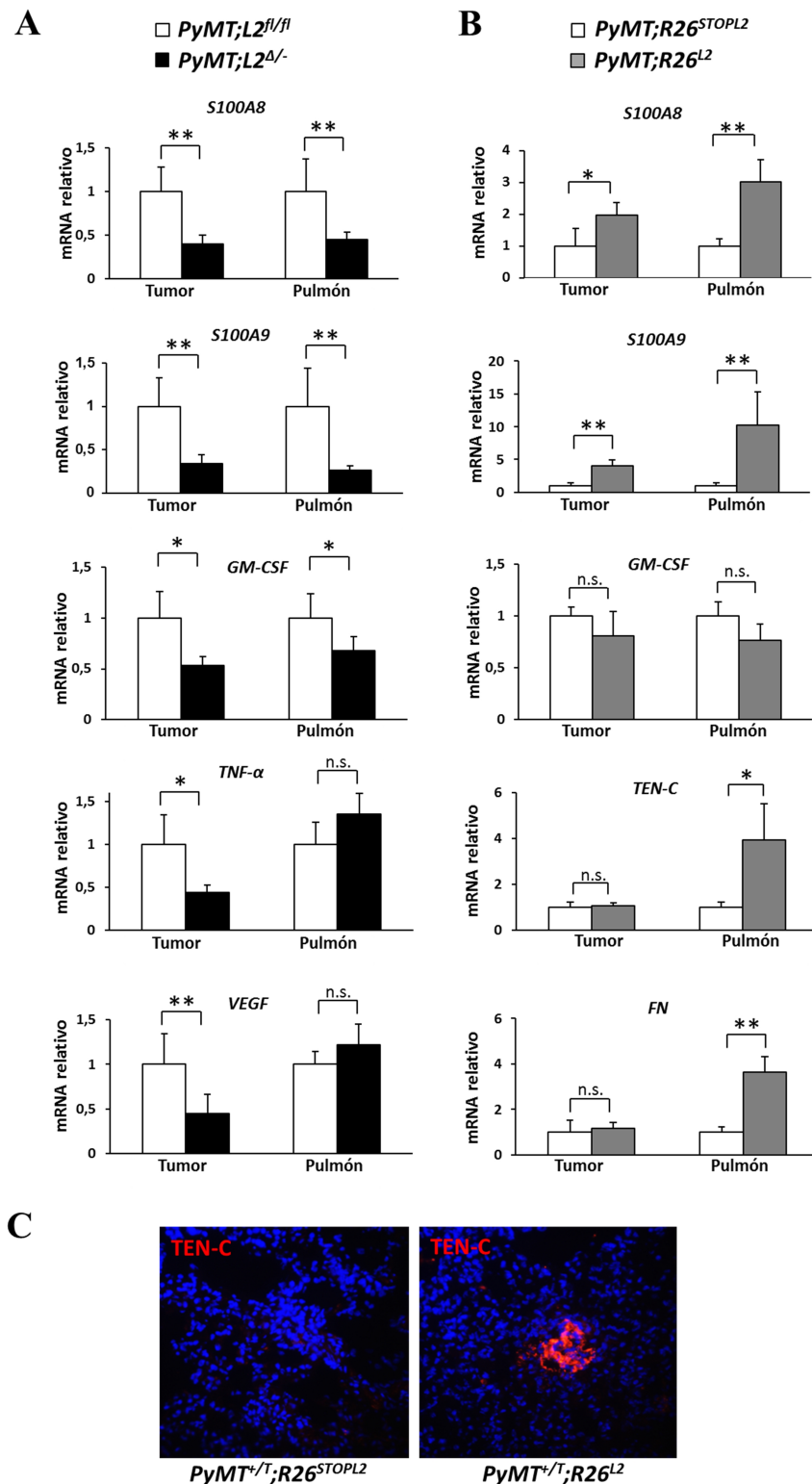


Figura 37. Análisis de los factores implicados en la formación del nicho pre-metastásico. (A) PCR cuantitativa de las citoquinas *S100A8*, *S100A9*, y los factores *GM-CSF*, *TNF-α* y *VEGF* en muestras tumorales y de pulmón procedentes de ratonas *PyMT;L2^{fl/fl}* y *PyMT;L2^{Δ/-}*. **(B)** PCR cuantitativa de las citoquinas *S100A8*, *S100A9*, el factor *GM-CSF*, *tenascina-C* (*TEN-C*) y *fibronectina* (*FN*) en muestras tumorales y de pulmón de ratonas *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}*. Para los análisis por PCR cuantitativa se utilizó RNA procedente de 5 tumores primarios y 4 pulmones por cada genotipo. Los resultados muestran la media de, al menos, dos experimentos independientes. Barras, error estándar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; n.s.= no estadísticamente significativo. **(C)** Imagen representativa de la tinción inmunofluorescente para *TEN-C* en pulmones de animales *PyMT;R26^{STOPL2}* y *PyMT;R26^{L2}*. Ambas imágenes fueron tomadas con el objetivo de 40X.

En conjunto, estos datos demuestran que *Loxl2* participa de manera crítica en el establecimiento de las etapas tempranas de la metástasis, regulando la expresión de varias citoquinas y proteínas de matriz extracelular.

6.3 Estudio de la contribución de *Loxl2* a la metástasis mediante mecanismos intrínsecos a las células tumorales (“*cell autonomous*”).

Para examinar en mayor detalle el efecto de la eliminación de *Loxl2* en el potencial tumorigénico y metastásico, se obtuvieron cultivos celulares a partir de tres tumores de mama independientes procedentes de ratonas control *PyMT*;*L2*^{fl/fl}. Las tres líneas celulares obtenidas fueron manipuladas posteriormente *in vitro* mediante la introducción lentiviral de los genes reporteros *GFP* y *Luciferasa* (*GFP-Luc*). Posteriormente, estas células fueron infectadas con adenovirus que expresaban *GFP* (PyMT-Control) o la recombinasa *Cre* (PyMT-Cre), obteniéndose células control y KO para *Loxl2* procedentes de un mismo cultivo primario (Figura 38A). La escisión de *Loxl2* fue confirmada a nivel de mRNA (Figura 38B).

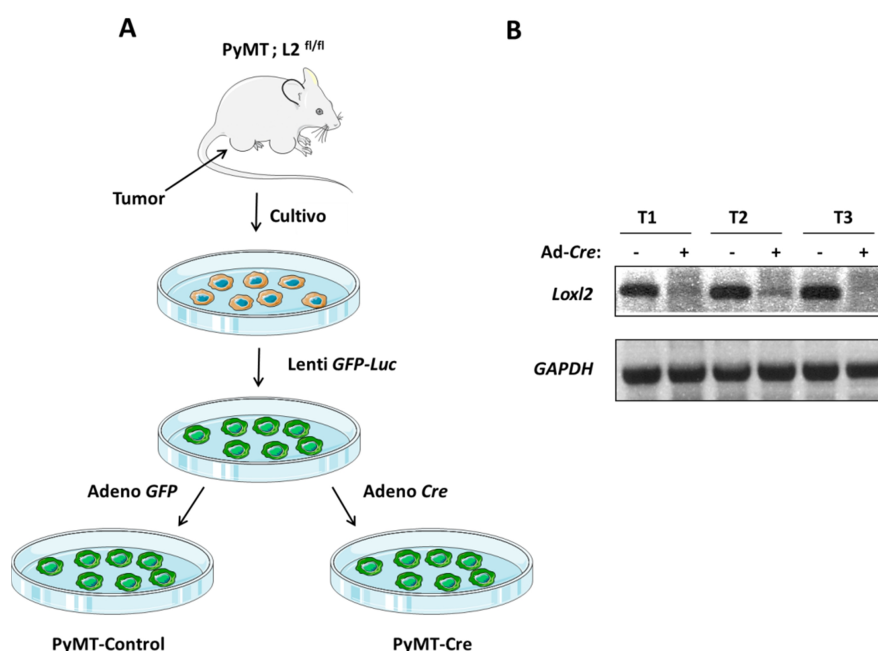


Figura 38. Cultivo primario e infección de células derivadas del modelo *PyMT*. (A) Esquema representando la estrategia seguida para la obtención de líneas celulares *PyMT*. Células derivadas de tumores de una ratona de genotipo *PyMT*;*L2*^{fl/fl} fueron aisladas y puestas en cultivo. Tras la infección lentiviral con el vector *GFP-Luc*, las células fueron infectadas de nuevo con adenovirus que expresaban *GFP* o la recombinasa *Cre*, de modo que se obtuvieron células control y KO para *Loxl2* procedentes de un mismo cultivo primario. (B) La delección de *Loxl2* fue confirmada mediante PCR semicuantitativa en cada uno de los 3 cultivos procedentes de tumores independientes (T1, T2, T3).

A continuación, las células PyMT-Control y PyMT-Cre de las 3 líneas celulares, y sus controles, se inyectaron por duplicado en la grasa de la glándula mamaria de ratonas

inmunodeprimidas (*nu/nu*), monitorizando el crecimiento tumoral (Figura 39A). Las células control fueron capaces de formar tumores medibles a partir de los 25 días frente a las células PyMT-Cre, que produjeron lesiones algo más pequeñas en el mismo periodo de tiempo. (Figura 39B). Cuando los tumores alcanzaron 1 cm de diámetro, fueron extraídos quirúrgicamente, analizando posteriormente la capacidad de generar metástasis espontánea en el pulmón. 75 días después de la inyección de las células, las ratonas fueron sacrificadas, observándose que la carga metastásica en los pulmones de animales inyectados con células PyMT-Cre era claramente menor que la de las ratonas portadoras de células PyMT-Control (Figura 39C).

Para analizar el papel de *Loxl2* dependiente de las células tumorales *per se* (“*cell autonomous*”) sin la injerencia del condicionamiento ejercido por el tumor primario, se llevaron a cabo ensayos de metástasis experimental mediante la inyección de las células en la vena de la cola (Figura 39A). La delección de *Loxl2* en las células tumorales bloqueó por completo la colonización del pulmón (Figura 39D y E). Estos datos sugieren que *Loxl2* es necesaria para la colonización metastásica incluso en ausencia del tumor primario, lo que pondría de manifiesto la existencia de mecanismos *cell-autonomous*.

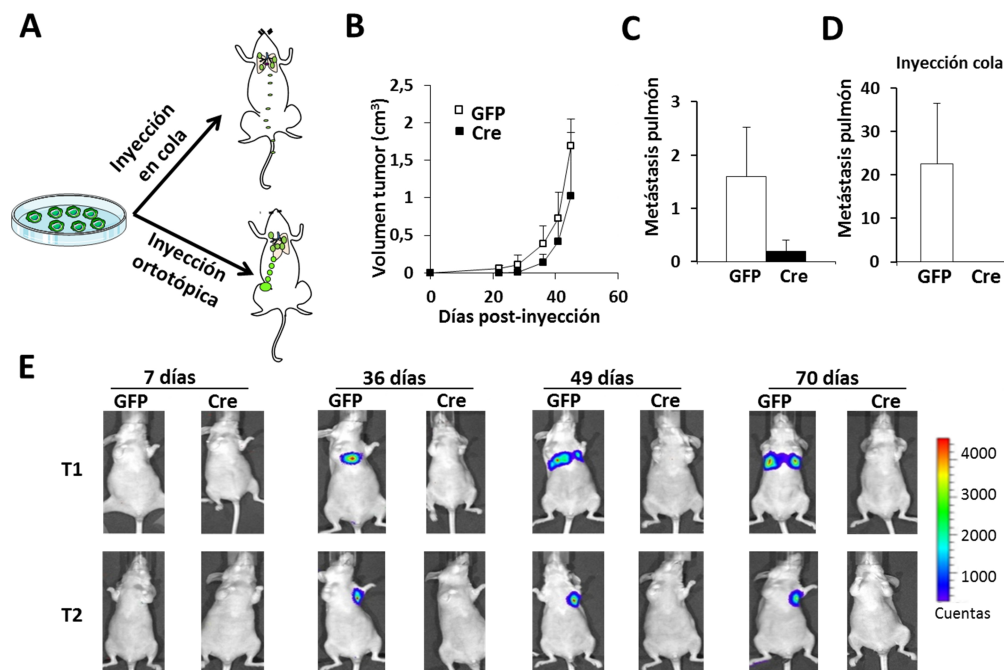


Figura 39. Ensayos *in vivo* con células derivadas de tumores PyMT. (A) Esquema de la estrategia experimental seguida durante los ensayos de inyección ortotópica en mama y en la vena de la cola. (B) Cuantificación del tamaño del tumor a diferentes tiempos tras la inyección de las células (control: GFP y KO: Cre) en la glándula mamaria. (C) Medida de la carga metastásica en pulmón 2,5 meses después de la inyección de las células. (D) Medida de la carga metastásica en pulmones de ratonas inyectadas en la cola 70 días tras la inyección. (E) Imágenes de bioluminiscencia representativas de los ratones desnudos inyectados en la vena de la cola con células PyMT-Control y PyMT-Cre a los tiempos indicados. La escala de color representa el flujo de fotones (fotones por segundo: cuentas) emitidos por el pulmón afectado. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado (dos ratones inyectados por cada infección Ad-Cre/Ad-GFP) con los cultivos celulares estables derivados de los tres tumores distintos. Se muestran los resultados obtenidos en dos de ellos.

6.4. Estudio de la influencia de *Loxl2* en la organización de la MEC en tumores del modelo *PyMT*.

Estudios previos del grupo de la Dra. Valerie Weaver (UCSF) demostraron que la tumorigénesis mamaria estaba acompañada por un elevado entrecruzamiento, mediado por LOX, de las fibras de colágeno, lo que provoca un aumento de la rigidez o “*stiffness*” de la MEC, favoreciendo la progresión tumoral y la invasión mediante un aumento de las adhesiones focales (Levental et al., 2009). Paralelamente, estudios de otros grupos también indicaron un papel extracelular de LOXL2 en la MEC de los carcinomas de mama (Barker et al., 2011; Barry-Hamilton et al., 2010). Sin embargo, nuestros estudios previos destacaron el papel intracelular de LOXL2 en la metástasis de cáncer de mama (Canesin et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011). Para analizar más detalladamente la posible implicación de *Loxl2* extracelular en la homeostasis de la MEC, examinamos el estado de la misma en los tumores derivados de ratonas *PyMT* en los modelos de ausencia y sobreexpresión de *Loxl2*.

En primer lugar, la MEC de los tumores primarios de ratones de 14 semanas de edad fue analizada mediante la tinción con rojo sirio. Al comparar los tumores de ratones *PyMT;L2^{Δ/-}* y *PyMT;R26^{L2}* con sus controles respectivos, no se observaron diferencias en términos de color, tamaño o disposición de las fibras de colágeno (Figura 40A y C). La cuantificación del área birrenfringente (colágeno fibrilar) tampoco mostró diferencias significativas entre los diferentes genotipos (Figura 40B y D).

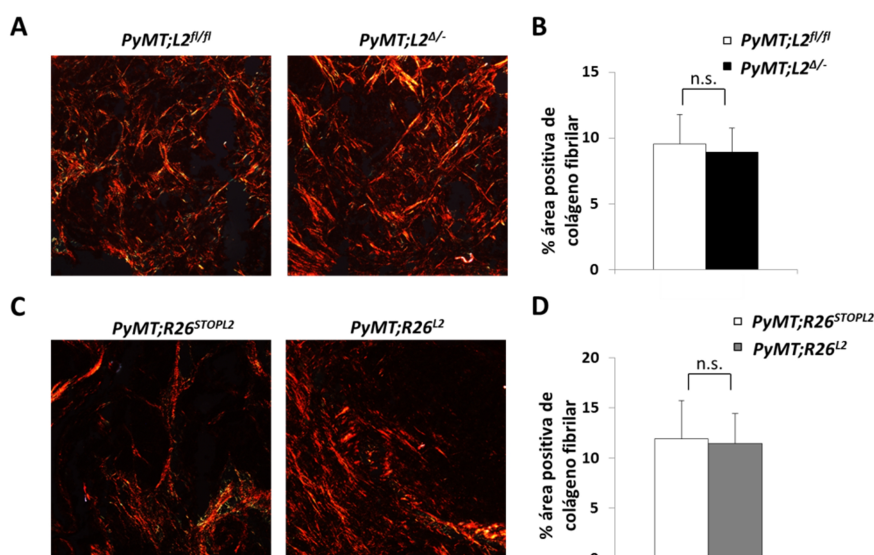


Figura 40. Análisis mediante tinción con rojo sirio de las muestras tumorales *PyMT* de ratones A 14 semanas. Imágenes representativas de la tinción con rojo sirio (10X) mostrando el colágeno fibrilar en tumores *PyMT;L2^{Δ/-}* (A) y *PyMT;R26^{L2}* (C), y sus controles respectivos. Cuantificación del contenido de colágeno fibrilar en tumores del modelo *PyMT* KO (B) y de sobreexpresión (D) de *Loxl2*, y sus controles respectivos. Los datos representan la cuantificación de 4 tumores de distintos ratones para cada condición. Se tomaron medidas de, al menos, 5 zonas de cada tumor analizado. Barra, desviación estándar. n.s.: no significativo estadísticamente.

Para profundizar un poco más en el estado de la MEC, en colaboración con el grupo de la Dra. Valerie Weaver, las muestras de los tumores primarios de los diferentes modelos tumorales para *Lox12* fueron sometidas a un estudio mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Este tipo de microscopía permite cuantificar el grado de rigidez (*stiffness*) que tiene la MEC que rodea al tumor como consecuencia del entrecruzamiento de las fibras de colágeno del estroma tumoral (Lopez et al., 2011). Los datos obtenidos mediante esta técnica claramente demostraron que no existen diferencias en términos de *stiffness* entre los tumores de las ratonas *PyMT;L2^{Δ/-}* y *PyMT;R26^{L2}* y sus controles correspondientes (Figura 41A y B).

En conjunto, estos resultados descartan la implicación de *Lox12* en la remodelación de la MEC de los tumores primarios de mama en el modelo *PyMT*.

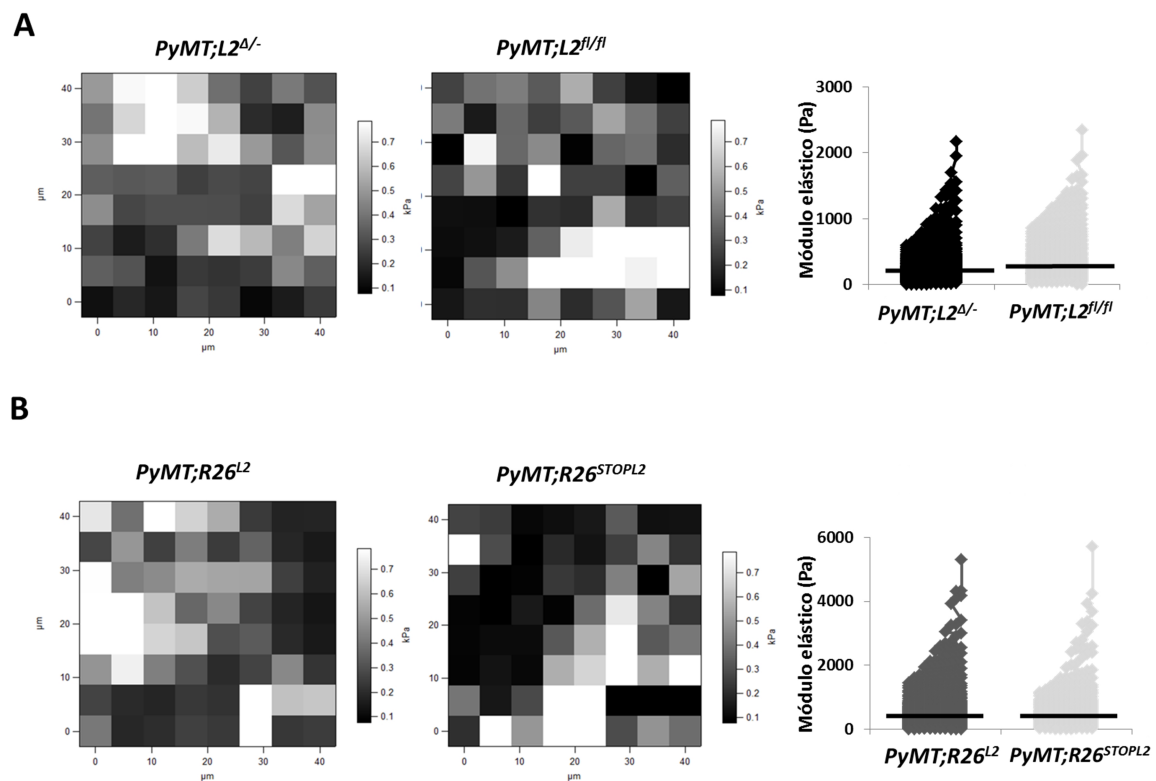


Figura 41. Medición del *stiffness* de los tumores *PyMT* mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) en ratonas de 14 semanas. Se muestran imágenes representativas del campo de fuerza (40 μm x 40 μm) (paneles izquierda) de regiones ricas en estroma de los tumores de ratonas *PyMT;L2^{Δ/-}* (**A**) y *PyMT;R26^{L2}* (**B**), y sus controles respectivos. Las zonas de la imagen con colores más claros representan zonas de mayor *stiffness*. Los paneles de la derecha muestran el análisis cuantitativo de los datos de AFM. No se encontraron diferencias significativas entre los tumores de hembras *PyMT;L2^{Δ/-}* y *PyMT;L2^{fl/fl}* (**A**), ni entre tumores de ratones *PyMT;R26^{L2}* y *PyMT;R26^{STOPL2}* (**B**). Las barras negras representan la media de las mediciones, en unidades de presión (Pa), realizadas en los distintos grupos de animales. *PyMT;L2^{Δ/-}* = 260,78 Pa; *PyMT;L2^{fl/fl}* = 353,17 Pa; *PyMT;R26^{L2}* = 418,77; *PyMT;R26^{STOPL2}* = 401,5 Pa. Los datos representan 3 ratones de cada condición, con dos secciones de tejido por cada animal. Se realizaron medidas en, al menos, 5 zonas distintas de cada sección analizada.

Discusión

Durante la última década, el desarrollo de modelos animales transgénicos para algunos genes de la familia *Lox* ha ayudado a comprender el papel fisiológico de los miembros de la familia de las lisil oxidasas. Así, la delección constitutiva de *Lox* en ratón afecta al desarrollo y la función del sistema cardiovascular. Estos ratones mueren perinatalmente debido a aneurismas aórticos y ruptura diafragmática (Hornstra et al., 2003; Maki et al., 2002). Por su parte, la delección constitutiva de *Lox1* ha indicado que tiene un papel crítico durante el proceso de elastogénesis de órganos como el útero, la piel o el pulmón (Liu et al., 2004). En cuanto a *Lox12*, a pesar de los múltiples procesos biológicos en los que se ha descrito su participación activa (Barker et al., 2011; Bignon et al., 2011; Cano et al., 2012; Fujimoto and Tajima, 2009), no existen apenas estudios que hayan realizado abordajes con organismos modificados genéticamente que permitan conocer el verdadero alcance de las funciones fisiológicas y patológicas de *Lox12* en un contexto *in vivo*. Tan sólo, el silenciamiento de su expresión en el pez cebra, mediante oligonucleótidos antisentido (morfolinos), indicó la implicación de *Lox12* en la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales (Bignon et al., 2011). Con la finalidad de determinar la contribución *in vivo* de *Lox12* tanto a la homeostasis tisular como tumoral, hemos generado modelos murinos de delección y sobreexpresión de *Lox12* mediante técnicas de *gene targeting* convencionales.

1. LA AUSENCIA DE *Lox12* PROVOCA LETALIDAD PERINATAL.

Como se describió en el apartado de resultados, alrededor del 50% de los animales *L2^{-/-}* mueren perinatalmente, observándose que el 25% de los animales KO afectados presentan defectos cardíacos severos debidos a la formación incompleta del septo ventricular. Además, en algunos de los ratones *L2^{-/-}* también se observan disfunciones hepáticas vasculares causadas por distensión de los capilares sanguíneos. La alta expresión de *Lox12* detectada en el corazón de ratones P1 normales refuerza la implicación de *Lox12* en las funciones del tejido cardíaco.

En la actualidad, todavía no se conocen completamente los mecanismos moleculares que regulan la formación del corazón y la contribución de la MEC a su correcto funcionamiento (Lockhart et al., 2011; Van Vliet et al., 2012; von Gise and Pu, 2012). Recientemente, se ha demostrado que el factor de transcripción helicasa-like (*Hltf*) regula la biogénesis del colágeno en el corazón de ratón al activar directamente la transcripción de *Hif-1α* y, en consecuencia, la de sus genes diana, algunos de ellos relacionados con al remodelación de la MEC, como *Lox12* (Helmer et al., 2013). Así, los ratones nulos para *Hltf* presentan letalidad perinatal y muestran un aspecto cianótico, característico de un problema cardiorespiratorio, al igual que los neonatos *L2^{-/-}*. El análisis del tejido cardíaco de los ratones nulos para *Hltf* indicaba una clara

desorganización de la MEC, con fibras de colágeno perivascular e intersticial más cortas y delgadas que las de los ratones control (Helmer et al., 2013). La reducción observada de los niveles de *Loxl2* en estos animales sugiere que el fenotipo de los ratones $L2^{-/-}$ podría deberse a un defecto en la organización de las fibras de colágeno en el septo ventricular y potencialmente también en otras regiones del corazón, lo cual podría explicar la muerte del resto de los animales afectados. Un futuro análisis de la MEC del corazón de los ratones transgénicos $L2^{-/-}$ podría ayudar a obtener una explicación mecánica de la letalidad causada por la ausencia de *Loxl2*. Por otra parte, no se han observado defectos anatómicos en los animales $L2^{-/-}$ supervivientes durante la fase adulta, ni tampoco a edades avanzadas (datos no mostrados). No obstante, serán necesarios estudios adicionales para determinar la posible susceptibilidad de los animales $L2^{-/-}$ a alteraciones cardíacas en respuesta a diferentes tipos de estrés.

2. LA SOBREENPRESIÓN DE *Loxl2* CAUSA ESTERILIDAD EN MACHOS.

Los ratones $R26^{L2/L2}$ eran perfectamente viables y tanto machos como hembras nacían según la frecuencia mendeliana esperada. El análisis histológico de estos animales no mostró alteraciones en la práctica totalidad de los órganos examinados; entre ellos el riñón, el hígado y el pulmón, donde se había descrito una correlación entre la sobreexpresión de *Loxl2* y el desarrollo de procesos fibróticos (Barry-Hamilton et al., 2010; Higgins et al., 2007; Vadasz et al., 2005). Probablemente, los niveles de *Loxl2* en los ratones $R26^{L2/L2}$ no son suficientemente altos como para inducir fibrosis en estos órganos, si bien otra posibilidad es que la sobreexpresión *Loxl2* por sí sola no pueda desencadenar el desarrollo de estas patologías y necesite de eventos mutacionales o medioambientales adicionales. Sería interesante analizar la respuesta a estímulos fibróticos (Fujii et al., 2010; Izbicki et al., 2002; Zeisberg et al., 2005) en el modelo transgénico de sobreexpresión de *Loxl2* en los diferentes tejidos citados.

Una de las observaciones más relevantes del fenotipo de los ratones de sobreexpresión de *Loxl2* fue la esterilidad detectada en más del 90% de los machos $R26^{L2/L2}$, asociada a una atrofia importante en el testículo e hiperplasia en el epidídimo. Este fenotipo sólo era apreciable en ratones homocigotos y más acusado en animales longevos, cuando los niveles de *Loxl2* acumulados eran mayores, sugiriendo así que el efecto de *Loxl2* en este contexto es dosis-dependiente.

La sobreexpresión de *Loxl2* en ratón provocó una degeneración parcial de los túbulos seminíferos. A pesar de que algunas zonas estaban algo desorganizadas y tenían baja densidad

celular, el proceso de espermatogénesis parecía no estar alterado. La meiosis se producía con normalidad y tanto espermátidas como espermatozoides pudieron ser detectados. Además, otras células importantes en el testículo, como células de Sertoli y de Leydig, no estaban afectadas. Sin embargo, a partir de los cuatro meses de edad, la presencia de espermatozoides en el epidídimo de ratones $R26^{L2/L2}$ ya no era observable, indicando la existencia de algún problema en este órgano que afectaba a la viabilidad de los gametos. El epidídimo de animales $R26^{L2/L2}$ presentaba un proceso inflamatorio severo y sus túbulos estaban dilatados. Además, las células que componían el epitelio parecían estar atrofiadas y se observaron regiones con metaplasia de células escamosas (Figura 19). Durante el tránsito a lo largo del lumen del epidídimo, los espermatozoides maduran y adquieren su capacidad mótil gracias a procesos que implican la adición o eliminación de moléculas de la superficie celular (Dacheux et al., 1989). El microambiente del lumen está formado por iones, pequeñas moléculas orgánicas y proteínas que son secretadas o absorbidas por el epitelio y que juegan un papel crítico en la viabilidad de los espermatozoides (Hermo et al., 1994). Para mantener este entorno adecuado, proteínas de la familia de las ocludinas, claudinas, cateninas y cadherinas se organizan en el epitelio para constituir la llamada barrera hemato-epididimiaria (Cyr et al., 2007). Algunos estudios han relacionado en humanos la azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen) con alteraciones de estos componentes (Dube et al., 2010). Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que LOXL2 es capaz de regular negativamente la transcripción de *cadherina-E* y *claudina-1* (Cuevas et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011). De forma notable, los epidídimos de los ratones que sobreexpresaban Loxl2 mostraban unos niveles de estas proteínas significativamente reducidos en comparación con animales control, corroborando por primera vez *in vivo* esta función represora de Loxl2. Nuestros datos muestran que en el epidídimo de un ratón normal claudina-1 no sólo se localiza en las zonas apicales donde se constituyen las uniones estrechas, sino que también está presente en áreas donde las células principales contactan con las células basales. Además, también se detecta a lo largo de toda la membrana plasmática en la región del epitelio que descansa sobre la lámina basal (Figura 20). Esta particular localización de claudina-1 ya había sido observada en epidídimos humanos y de rata, sugiriendo que, además de ser un componente de las uniones estrechas, esta proteína podría tener funciones de adhesión entre células principales y basales y podría estar implicada en la interacción de estas últimas con moléculas de la lámina basal (Dube et al., 2007; Gregory et al., 2001). Curiosamente, el descenso de los niveles de claudina-1 en los ratones $R26^{L2/L2}$ sólo fue apreciable en el componente basal del epitelio, donde se localiza la expresión de Loxl2, y no en las regiones apicales donde se encuentran las uniones estrechas. Gregory et al. describieron que la localización de claudina-1 en la región apical de

las células principales estaba regulada por andrógenos (Gregory et al., 2001). Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos que regulan la localización de esta proteína en el componente basal del epitelio. Nuestros datos ponen de manifiesto que la sobreexpresión de Loxl2 inhibe la expresión de claudina-1 en las células basales del epidídimo y de cadherina-E en células basales y principales. Por otro lado, la función de las células basales no ha sido completamente esclarecida. Algunos trabajos sostienen que tienen un papel en la protección de los espermatozoides contra la respuesta autoinmune dada su similitud con macrófagos y su origen extratubular (Seiler et al., 1998; Yeung et al., 1994). Además, se sabe que estas células son productoras de glutatión peroxidasas (Veri et al., 1993), enzimas que se han relacionado con la protección de los espermatozoides frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chabory et al., 2010; Noblanc et al., 2012). Estudios más recientes proponen que las células basales del epidídimo colaboran con la formación de la barrera hemato-epididimaria a través de moléculas de adhesión celular (Arrighi, 2013). Nuestros resultados apoyan que la pérdida de claudina-1, cadherina-E y γ -catenina causada por la sobreexpresión de Loxl2 podría provocar que las células basales perdieran su funcionalidad.

El estudio del componente estromal del epidídimo en animales $R26^{L2/L2}$ indicó que también estaba profundamente afectado, mostrando una inflamación considerable y un aspecto fibrótico. El análisis de diversos componentes de la MEC mostró que la sobreexpresión de Loxl2 induce un aumento claro de la deposición de colágeno, fibronectina y elastina. Estas fibras pasaron de tener una localización restringida a la zona basal de los conductos en ratones $R26^{+/+}$ a extenderse por todo el estroma del epidídimo en animales $R26^{L2/L2}$, indicando que los niveles suprafisiológicos de Loxl2 inducen fibrosis en este órgano. Además, en los epidídimos de ratones que sobreexpresaban Loxl2, la integrina $\beta 4$ estaba focalizada en la región de la membrana basal del epitelio frente a una localización más dispersa en ratones control. Numerosos trabajos han propuesto que procesos como la fibrosis, la TEM y el cáncer están relacionados con la señalización vía integrinas (Margadant and Sonnenberg, 2010). La sobreexpresión de Loxl2 en el epidídimo podría estar modulando el proceso mecanotransductor mediado por estas moléculas a causa de las alteraciones producidas en la MEC, como ya se ha descrito para la lisil oxidasa prototípica en otros contextos (Levental et al., 2009). Por último, cabe destacar que aunque algunos miembros de la familia LOX ya habían sido relacionados con fibrosis (Barry-Hamilton et al., 2010; Higgins et al., 2007; Vadasz et al., 2005), ningún trabajo hasta la fecha había establecido convincentemente una relación de causalidad entre el proceso fibrótico y la sobreexpresión de algún miembro de la familia lisil oxidasa, como el observado en el presente estudio.

Algunos de los efectos observados en el epidídimo de ratones $R26^{L2/L2}$ guardan cierta similitud con el fenotipo que provoca la eliminación del gen supresor de tumores “*von-hippel lindau*” (VHL) (Frew et al., 2008). Se sabe que VHL forma parte del complejo ubiquitin ligasa que cataliza la degradación vía proteasoma de los factores HIF (Sims, 2001). Teniendo en cuenta que la expresión de *LOXL2* está modulada positivamente por HIF-1 (Schietke et al., 2010), la ausencia de VHL resultaría en un aumento de los niveles de *Loxl2* que podrían explicar, al menos parcialmente, los defectos del epidídimo de esos ratones, como por ejemplo el incremento del número de vasos sanguíneos observado (Frew et al., 2008). Este dato, además, estaría de acuerdo con el papel atribuido a *Loxl2* durante el proceso de angiogénesis en el pez cebra (Bignon et al., 2011).

A la vista de estos resultados, proponemos que la sobreexpresión de *Loxl2* provocaría defectos estructurales en el epidídimo que afectarían negativamente a la función de las células basales del epitelio. Dada la importancia de este tipo celular para el mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria, la pérdida de su funcionalidad afectaría a la homeostasis del lumen mermando así la viabilidad de los espermatozoides o incluso provocando una respuesta autoinmune acompañada de inflamación. Probablemente, la acumulación de espermatozoides inviábiles en el epidídimo provocaría problemas secundarios en el testículo que resultarían en una desorganización heterogénea de los túbulos seminíferos, la formación de espermatoceles y la posterior degeneración con la edad. Además, es importante destacar que, posiblemente, el H_2O_2 producido durante la catálisis mediada por *Loxl2* sobre la MEC podría afectar directamente a la funcionalidad de los espermatozoides (Figura 42). No obstante, sería muy interesante poder discernir cuáles de los efectos observados en el epidídimo son dependientes de la actividad catalítica de *Loxl2* y cuáles son independientes. En este contexto, hay que mencionar que estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que la represión de *claudina-1* y *cadherina-E* mediada por *LOXL2* es independiente de su actividad catalítica en modelos celulares de epitelios simples (Cuevas et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011). El modelo de ratón de sobreexpresión de *Loxl2* puede ser utilizado como herramienta para estudiar algunos tipos de infertilidad y patologías relacionadas con inflamación y fibrosis del epidídimo (epididimitis). Por último, merece la pena destacar que los ratones modificados genéticamente para *Loxl2* ($L2^{-/-}$ y $R26^{L2/L2}$) no producen fenotipos complementarios, señalando la importancia que tiene el desarrollo de modelos de pérdida y ganancia de función para poder comprender las funciones de las proteínas en la fisiología animal.

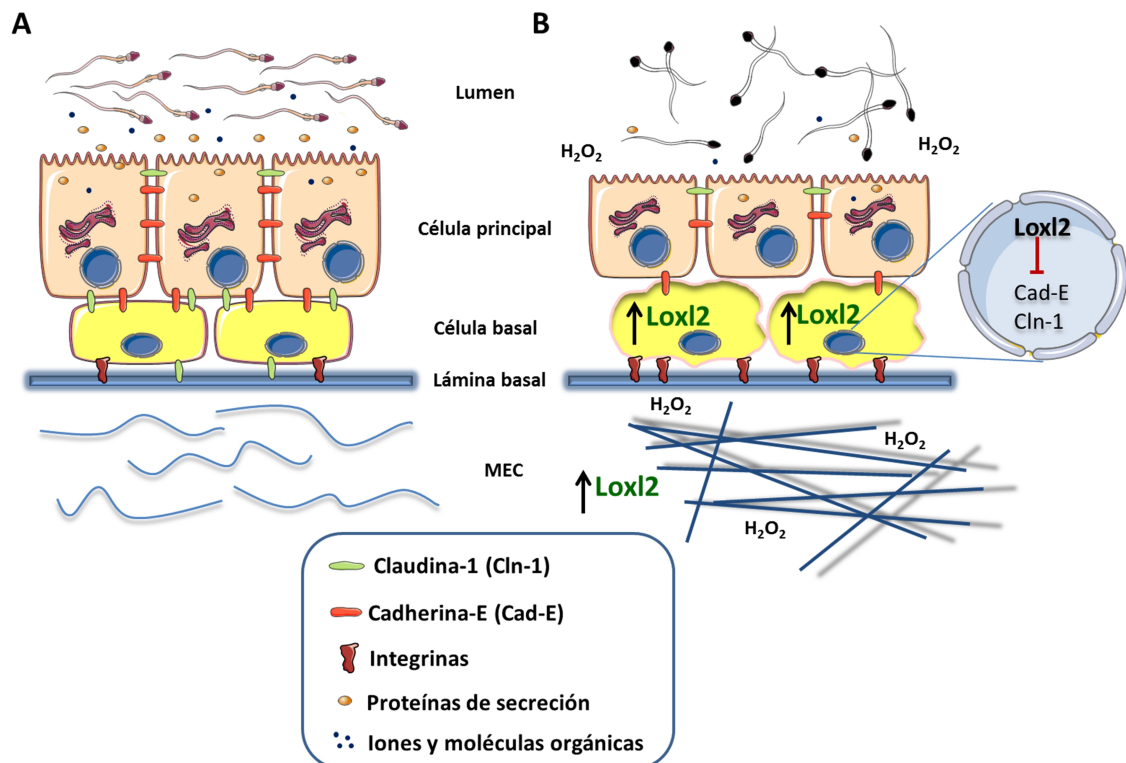


Figura 42. Modelo de los defectos en el epidídimo causados por la sobreexpresión de Loxl2. (A) Los túbulos de un epidídimo normal presentan un epitelio bien organizado gracias a numerosas moléculas implicadas en uniones intercelulares. La proteína claudina-1 no solo se encuentra restringida a la parte apical del epitelio, sino que también se localiza en el componente basal. La cadherina-E es una de las principales moléculas de adhesión en este sistema. La correcta organización de los componentes epiteliales permite crear un microentorno adecuado, necesario para la motilidad y la maduración de los espermatozoides. (B) La sobreexpresión de Loxl2 en las células basales reprime la expresión de cadherina-E y claudina-1 alterando la funcionalidad de las mismas y en consecuencia también la de las células principales, lo cual afectaría la función de la barrera hemato-epididimaria. Esto provocaría una alteración bioquímica del lumen del epidídimo que impediría la viabilidad de los espermatozoides. La fibrosis generada por Loxl2 en el estroma podría favorecer la activación, a través de integrinas, de numerosas vías de señalización celular que contribuirían adicionalmente a agravar los defectos previamente mencionados. Por último, la posible producción de peróxido de hidrógeno por Loxl2 durante la catálisis también podría mermar la viabilidad de los gametos.

3. PAPEL DE Lox|2 EN LA HOMEOSTASIS DE LA PIEL.

La piel es una barrera fisiológica que protege al organismo del estrés medioambiental. La epidermis de un organismo adulto está sujeta a un programa de diferenciación terminal en el que las células del estrato basal van desplazándose hacia los estratos suprabasales, sufriendo una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que las llevan a un estado más diferenciado hasta culminar con la descamación de los queratinocitos atróficos (Figura 4) (Blanpain and Fuchs, 2009). Algunos estudios han conferido un papel relevante a las lisil oxidasas en la homeostasis de la piel normal, relacionándolas principalmente con el mecanismo de regulación recíproca descrito para dos de sus miembros, LOX y LOXL2 (Fujimoto and Tajima, 2009). Estudios funcionales apoyan un papel positivo de LOX en la diferenciación de queratinocitos (Le Provost et al., 2010). Contrariamente, LOXL2 se ha propuesto como un

inhibidor de la diferenciación epidérmica (Lugassy et al., 2012; Peinado et al., 2008), y su expresión se induce en respuesta a interacciones célula-MEC (Fujimoto and Tajima, 2009).

Los modelos animales modificados genéticamente para *Loxl2* han permitido evaluar de un modo más preciso el papel fisiológico de *Loxl2* en la homeostasis de la epidermis *in vivo*. Aunque a nivel histológico no se detectaron cambios estructurales llamativos, el análisis de distintos marcadores de diferenciación en pieles de neonatos y adultos tratados con TPA reveló que *Loxl2* inhibe parcialmente la diferenciación terminal. Así, se detectó un incremento significativo de las citoqueratinas suprabasales y del marcador de diferenciación terminal loricrina en la epidermis del ratón *L2^{-/-}*, frente a una tendencia antagónica detectada en los animales de sobreexpresión (Figura 23). Se obtuvieron resultados similares en experimentos de diferenciación *in vitro* con queratinocitos primarios derivados de los modelos genéticos. Significativamente, el hecho de que cambios drásticos en la expresión de *Loxl2* afecten a los niveles de *Lox* durante la diferenciación confirma que los dos miembros de la familia se regulan recíprocamente y de manera negativa en un contexto fisiológico (Fujimoto and Tajima, 2009), aunque el mecanismo subyacente es todavía desconocido. Sorprendentemente, los niveles de cadherina-E y claudina-1, regulados por *Loxl2* en varias líneas celulares epiteliales (Cuevas et al., 2014; Moreno-Bueno et al., 2011; Peinado et al., 2008) y en el epidídimo (presente trabajo), no se vieron afectados durante la diferenciación terminal de la epidermis, indicando probablemente la existencia de mecanismos independientes de *Loxl2* para el control de la maquinaria de adhesión celular en este contexto en particular.

Las alteraciones en el patrón de diferenciación observadas en respuesta a la perturbación de los niveles de *Loxl2* podrían deberse a un proceso de adhesión anómalo entre los queratinocitos y la MEC, tal y como señalaban algunos estudios previos (Fujimoto and Tajima, 2009). Sin embargo, los experimentos llevados a cabo con queratinocitos derivados de ratones *L2^{-/-}* y *R26^{L2/L2}* mostraron que las propiedades de adhesión a colágeno IV no estaban afectadas por los niveles de *Loxl2*. Además, el análisis por inmunofluorescencia reveló que la ausencia o sobreexpresión de *Loxl2* no afectaba a la deposición del colágeno IV en la lámina basal, en contra de lo observado en el modelo de pez cebra durante la angiogénesis (Bignon et al., 2011).

En resumen, todas estas observaciones permiten concluir que *Loxl2* afecta parcialmente a la diferenciación terminal de la epidermis, si bien, no se puede descartar la existencia de mecanismos compensatorios o redundantes por parte de otros miembros de la familia. Por otra parte, el estudio de los modelos transgénicos de *Loxl2* ha permitido minimizar la

importancia inicialmente atribuida a *Loxl2* en el control de la homeostasis de la piel normal (Fujimoto and Tajima, 2009).

4. PAPEL DE *Loxl2* DURANTE LA CARCINOGENESIS QUÍMICA.

Los SCC epidérmicos son el segundo tipo de cáncer de piel más común (Xie, 2008). Se trata de neoplasias localmente invasivas que, a veces, poseen la capacidad de metastatizar en otros órganos. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión de *LOXL2* en SCC de cabeza y cuello (laringe) está asociada a mal pronóstico (Peinado et al., 2008). Sin embargo, otros estudios señalaron el efecto contrario, relacionando la baja expresión de *LOXL2* con la malignidad de estos tumores (Rost et al., 2003). Para profundizar en el papel de *Loxl2* en SCC, los modelos transgénicos de delección y sobreexpresión constitutiva de *Loxl2* se sometieron al protocolo estándar de carcinogénesis química de piel en dos estadios, consistente en la aplicación tópica del carcinógeno DMBA y del promotor tumoral TPA (Abel et al., 2009; Kemp, 2005).

Los ratones control comenzaron a desarrollar lesiones visibles a partir de las 7-8 semanas tras el tratamiento con DMBA en los dos modelos genéticos de *Loxl2*. La ausencia de *Loxl2* no influyó en el periodo de latencia, mientras que los animales con sobreexpresión de *Loxl2* redujo significativamente el periodo de latencia, detectándose las primeras lesiones al cabo de 5 semanas post-DMBA. La aplicación del carcinógeno DMBA provoca una mutación activadora en el oncogén *Harvey-ras* (*H-ras*) en algunas células de la epidermis (Balmain et al., 1984; Quintanilla et al., 1986). El empleo de TPA crea un ambiente celular favorable para el crecimiento de los queratinocitos mutados y la generación de papilomas (Karen et al., 1999). Probablemente, los elevados niveles de *Loxl2* desde el inicio del tratamiento hacen todavía más permisivo ese entorno, favoreciendo la aparición de las primeras lesiones. Sería interesante estudiar si *Loxl2* puede participar y cooperar en la activación de vías de señalización que favorecen un comportamiento más mitogénico durante las primeras etapas de la carcinogénesis, como puede ser la ruta de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*).

En cuanto al número de neoplasias contabilizadas, no se observaron cambios drásticos entre ratones *L2^{+/+}* y *L2^{-/-}*. Sin embargo, la sobreexpresión de *Loxl2* provoca que se generen casi el doble de tumores en comparación con los animales control correspondientes. Parece, por tanto, que células epidérmicas con altos niveles de *Loxl2* son mas susceptibles al efecto oncogénico del DMBA, lo que reforzaría el papel de *Loxl2* como oncoproteína en estrecha colaboración con otras vías de señalización, aun por determinar. Existe una gran controversia

sobre cuál o cuáles son las poblaciones celulares de la epidermis que dan origen a la formación de papilomas y SCC, implicando tanto a células madre (SCs: *stem cells*) del folículo piloso como a células basales progenitoras de la epidermis interfolicular (Lapouge et al., 2011; Morris et al., 1997; Morris, 2000). En lo que se refiere al nicho de SCs de la piel, se sabe que la vía Wnt/ β -catenina tiene un papel muy importante en su regulación en el folículo piloso, tanto en el tejido sano como en tumores epidérmicos (Gat et al., 1998; Malanchi et al., 2008). De hecho, β -catenina es esencial para el mantenimiento del potencial tumorigénico de las SCs del cáncer cutáneo (Malanchi et al., 2008). Hasta la fecha, no existen datos que relacionen a LOXL2 con la ruta de Wnt. Por ello, sería interesante estudiar si la sobreexpresión de Loxl2 favorece la activación de esta vía en papilomas o en queratinocitos transformados con el oncogén *ras*.

Por otro lado, la ausencia de Loxl2 afectó drásticamente al tamaño de los tumores. A partir de las semanas 14-16, las lesiones de los ratones KO fueron incapaces de seguir creciendo, a diferencia de lo que ocurre en los animales control (Figura 27). Este hecho indica que Loxl2 es necesaria para la progresión tumoral en etapas medias y tardías de la carcinogénesis. De forma destacada, una de las principales observaciones del estudio es que Loxl2 juega un papel fundamental en la malignización de los papilomas durante la carcinogénesis de piel. Así, la ausencia de la proteína dificulta la progresión a SCC, mientras que su sobreexpresión produce el efecto contrario (Figura 28). Loxl2 se detectó intracelularmente en papilomas y de manera aún mas intensa en SCC de ratones control y *R26^{L2/L2}*, validando el valor pronóstico de la localización intracelular de LOXL2 en SCC humanos (Peinado et al., 2008). Con estos resultados, podemos afirmar que Loxl2 es un marcador de mal pronóstico en SCC que puede ser utilizado como diana terapéutica para tratar este tipo de tumores. Además, nuestros datos despejan las dudas planteadas por otros grupos que señalaban a *Loxl2* como posible supresor tumoral en este tipo de neoplasias (Rost et al., 2003). Por otro lado, merece la pena destacar que el uso de modelos condicionales en epidermis (*K14/K15-Cre*) permitiría discernir el papel de la proteína en el componente epitelial frente al microentorno tumoral en este tipo de tumores.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos responsables de la acción de Loxl2 en la malignización de papilomas y dados los antecedentes que vinculan a la proteína con la diferenciación de queratinocitos malignos (Peinado et al., 2008), se analizó la expresión de diversas proteínas marcadoras de este proceso. Así, la delección de *Loxl2* incrementó la expresión de distintos marcadores de diferenciación en los papilomas tales como algunas citoqueratinas suprabasales (*K1/K10*), *involucrina* y *loricrina*. Significativamente, los animales

con sobreexpresión de *Lox12* mostraron una tendencia opuesta en la expresión de estos marcadores, reforzando así la función inhibitoria de la diferenciación epidérmica mediada por *Lox12*. De forma destacada, los niveles del mRNA de *Lox* aumentaron más de cien veces en papilomas carentes de *Lox12*, mientras que se observó una clara disminución en los papilomas con sobreexpresión de *Lox12*. Algunos estudios relacionan la expresión de *LOX* con baja supervivencia en carcinomas de cabeza y cuello (Erler et al., 2006). En cambio, otros trabajos indican que la proteína *LOX* está ausente en el componente epitelial de SCC y su silenciamiento induce el compartamiento invasivo de queratinocitos transformados en un modelo equivalente a la piel (Bouez et al., 2006). Los datos obtenidos en el presente trabajo junto con otros estudios previos (Fujimoto and Tajima, 2009), sugieren que la expresión de *Lox* podría estar regulada negativamente por *Lox12*, y asociada a un fenotipo más diferenciado. Sin embargo, no podemos descartar la hipótesis de que el incremento de los niveles de *Lox* sea simplemente una consecuencia del proceso de diferenciación inducido por la ausencia de *Lox12*, siendo necesarios estudios adicionales para aclarar la relación funcional entre ambas proteínas. El análisis de otros miembros de la familia *LOX* mostró que la eliminación de *Lox12* en papilomas se asocia al aumento de la expresión de *Lox13*, mientras que su sobreexpresión correlaciona negativamente con la expresión de *Lox13* y *Lox14*. Otros estudios han mostrado que *Lox14* está sobreexpresado y amplificado en SCC de cabeza y cuello (Gorogh et al., 2007; Holtmeier et al., 2003), pero hasta el momento no se ha descrito su relevancia funcional. Nuestros datos sugieren que *Lox12* también podría regular negativamente a otros miembros de la familia lisil oxidasa (aparte de *Lox*) y sería interesante estudiar si tienen un papel relevante en la diferenciación o si simplemente se trata de un mecanismo compensatorio sin repercusión funcional.

Debido a la implicación de la vía de Notch1 en el control de la homeostasis de la epidermis, donde actúa como un supresor tumoral (Lefort and Dotto, 2004; Nicolas et al., 2003), analizamos la implicación de *Lox12* en la regulación de la misma. El aumento y disminución de la expresión de componentes de la vía de señalización de Notch1 (*Notch1*, *Jagged1*, *Hes1*, *Hey1*) detectada en papilomas *L2^{-/-}* y *R26^{L2/L2}*, respectivamente, apoya que *Lox12* regula negativamente la ruta Notch en papilomas pre-malignos, estando por tanto de acuerdo con el papel atribuido a esta ruta en estudios previos (Lefort and Dotto, 2004; Pangelos and Massi, 2009; Watt et al., 2008). Sorprendentemente, no detectamos alteraciones en los niveles de expresión de *p53*, establecido como inductor transcripcional de Notch1 en epidermis y papilomas (Guinea-Viniegra et al., 2012; Lefort et al., 2007; Yugawa et al., 2007), en los modelos transgénicos para *Lox12*. Este hallazgo sugiere que *Lox12* podría actuar como

modulador negativo de la vía de Notch1, independientemente de otros reguladores que afectan al eje p53/Notch1, siendo necesarios estudios adicionales para clarificar este aspecto. En este sentido, merece la pena mencionar que la tensión intracelular de los queratinocitos basales de la epidermis permanece en un equilibrio con el microambiente externo a través de la reorganización y modificación de la MEC (Silver et al., 2003). Así, la activación de la ruta Rho/ROCK aumenta esta tensión celular favoreciendo el crecimiento y la progresión a SCC de lesiones de piel al incrementar el *stiffness* del microentorno tumoral (Samuel et al., 2011). Dada la participación de Notch1 en la regulación de las quinasas ROCK1/2 en SCC (Lefort et al., 2007), sería interesante estudiar el efecto de la delección y sobreexpresión de *Loxl2* en los procesos mecanotransductores mediados por estas vías de señalización.

En conjunto, los resultados obtenidos apoyan un importante papel de *Loxl2* en la iniciación y progresión a SCC. Así, la malignización de los papilomas estaría controlada, en parte, por la regulación negativa de la vía de Notch1 y la diferenciación terminal (Figura 43). Estos resultados abren nuevas oportunidades terapéuticas para el tratamiento de SCC con altos niveles de *Loxl2* basados en el uso combinado de inhibidores de la proteína con agonistas o potenciadores de la diferenciación. Este abordaje terapéutico se ve reforzado debido al escaso impacto que tendría el bloqueo de *Loxl2* en la homeostasis de la epidermis normal. No obstante, queda por establecer si los efectos ejercidos durante el proceso de carcinogénesis de piel son dependientes o independientes de la actividad catalítica de la proteína.

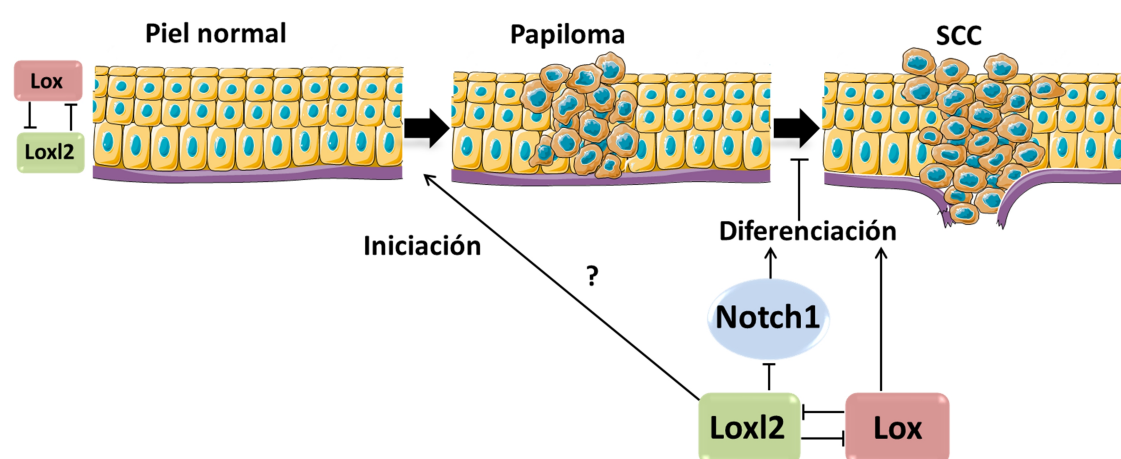


Figura 43. Esquema de las funciones propuestas para *Loxl2* durante la carcinogénesis química en piel. En la epidermis normal, *Lox* y *Loxl2* parecen regularse reciprocamente, controlando así el proceso de diferenciación terminal. *Loxl2* favorece las primeras etapas de la tumorigénesis durante el tratamiento con DMBA/TPA, acortando el periodo de latencia e incrementando el número de lesiones tumorales, por mecanismos desconocidos. Además, *Loxl2* inhibe el proceso de diferenciación terminal de papilomas y su progresión a SCC al reprimir la expresión de *Lox* y de genes relacionados con la vía de Notch1. En este contexto, *Lox* y *Loxl2* también tendrían una regulación recíproca, y jugarían papeles antagónicos durante la diferenciación tumoral.

5. LOXL2 EN CARCINOMAS DE MAMA.

5.1. Loxl2 en la progresión tumoral y la metástasis de carcinomas mama.

Numerosos estudios han mostrado la implicación de LOXL2 en la invasión y la metástasis de cáncer de mama (Barker et al., 2011; Barry-Hamilton et al., 2010; Canesin et al., 2014; Hollosi et al., 2009; Moreno-Bueno et al., 2011). En nuestro laboratorio describimos la asociación de la expresión LOXL2 con tumores basales de mama y con su incidencia metastásica (Moreno-Bueno et al., 2011). Para estudiar desde un punto de vista más fisiológico todas estas evidencias previas, generamos modelos condicionales de delección y sobreexpresión de *Loxl2* en el modelo de cáncer de mama basado en la expresión del oncogén *PyMT* (Lin et al., 2003). Las lesiones desarrolladas por estos ratones, aunque poseen características luminales, recapitulan todas las etapas de tumores de mama humanos y se considera un modelo fiable de la enfermedad (Herschkowitz et al., 2007; Lin et al., 2003). Según los resultados obtenidos, *Loxl2* no parece afectar al crecimiento del tumor primario en el contexto *in vivo* de *PyMT*. En contraposición, ensayos de inyección ortotópica con líneas celulares derivadas de estos modelos revelan que la ausencia de *Loxl2* retrasa ligeramente el crecimiento. Resultados similares de inhibición del crecimiento tumoral se observaron en otros sistemas ortotópicos donde *Loxl2* ha sido silenciada o inhibida en líneas celulares de mama como MDA-MB-231 (Moreno-Bueno et al., 2011), MDA-MB-435 (Barry-Hamilton et al., 2010) o Eo771 (Canesin et al. 2014), y en células procedentes de tumores gástricos (Peng et al., 2009) y SCC (Peinado et al., 2005; Peinado et al., 2008). El crecimiento tumoral en el modelo *in vivo* *PyMT* resulta difícil de monitorizar por su carácter multifocal y altamente agresivo, con lesiones no muy bien definidas y con tendencia a fusionarse entre sí, no permitiendo extraer conclusiones claras sobre la influencia de *Loxl2* en este parámetro.

Por otro lado, aunque todos los tumores analizados de los modelos *PyMT;L2^{Δ/-}* y *PyMT;R26^{L2}* se clasificaron como adenocarcinomas invasivos, cabe destacar que un porcentaje significativo de lesiones procedentes de ratones KO presentaban áreas más diferenciadas, características de carcinomas *in situ* no invasivos. Esto sugiere que pese a la agresividad de este modelo, *Loxl2* podría participar activamente en la progresión maligna del tumor primario.

En relación a los niveles de expresión de *Loxl2* y el potencial metastásico de las lesiones tumorales en el modelo *PyMT*, la delección de *Loxl2* en la glándula mamaria resultó en un dramático descenso del número y tamaño de focos metastásicos del pulmón, mientras que la sobreexpresión provocó un incremento del número de lesiones sin afectar al tamaño de las

mismas. Estos resultados ponen de manifiesto la gran relevancia de Loxl2 durante el proceso de metástasis de los carcinomas de mama. Además, el hecho de que la expresión del resto de los miembros de la familia lisil oxidasa apenas este afectada en estos modelos apoya, todavía más, la contribución específica de Loxl2 en la progresión y la metástasis de este tipo tumoral.

Existen evidencias de que LOXL2 puede ejercer su función protumorigénica e invasiva en tumores primarios de mama a través de acciones intracelulares (Moreno-Bueno et al., 2011) y extracelulares (Barker et al., 2011; Barry-Hamilton et al., 2010). Dado que la remodelación de la MEC, promovida por la actividad catalítica de LOX, aumenta el “*stiffness*” y promueve la progresión tumoral y la metástasis (Levental et al., 2009), nos planteamos estudiar si Loxl2 podría ejercer un papel similar. Para ello, analizamos el estado de la MEC en neoplasias mamarias procedentes de los ratones transgénicos para *Loxl2*. Los resultados obtenidos mostraron que la eliminación o sobreexpresión de *Loxl2* en el epitelio mamario no afecta a la cantidad ni a la disposición del colágeno fibrilar del tumor primario ni tampoco al *stiffness* de la MEC, indicando un papel diferencial entre Lox y Loxl2 en la progresión del cáncer de mama que apoya una función específica de Loxl2 independiente de la MEC del tumor primario.

5.2. Efectos de Loxl2 en la generación del nicho pre-metastásico.

Varios trabajos previos basados en modelos celulares *xenograft* de cáncer de mama relacionaron la expresión de diversos miembros de la familia LOX (LOX, LOXL2 y LOXL4) en el tumor primario con la formación del nicho pre-metastásico y con un aumento de la capacidad metastásica (Canesin et al., 2014; Erler et al., 2009; Wong et al., 2011). Según algunos modelos propuestos, LOX, LOXL2 y LOXL4 modificarían el colágeno IV de la membrana basal del pulmón facilitando el reclutamiento de células de estirpe mieloide CD11b+ (Erler et al., 2006; Wong et al., 2011) que a su vez favorecen la generación de un nicho pre-metastásico (Psaila and Lyden, 2009). Nuestros datos corroboran, en parte, estas observaciones previas en un sistema más fisiológico y revelan la existencia de una relación directa entre los niveles de Loxl2 y el reclutamiento en el pulmón de células CD11b+/Gr1+. Datos recientemente publicados por nuestro laboratorio indican que el silenciamiento de Loxl2 en la línea celular de cáncer de mama de ratón Eo771 reduce el reclutamiento de HPCs (Canesin et al., 2014), precursores hematopoyéticos tempranos con un estado todavía más indiferenciado que las células mieloides y cuya movilización hacia los órganos diana de la futura metástasis se postula anterior al de estas últimas (Kaplan et al., 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en los modelos *PyMT;L2^{Δ/-}* y *PyMT;R26^{L2}* indicaron que la población de HPCs no se encuentra alterada. Estos datos sugieren que Loxl2 regula la movilización de diferentes poblaciones de

BMDCs dependiendo del contexto tumoral. No obstante, no podemos descartar que existan alteraciones en la población de HPCs en etapas más tempranas del anidamiento metastásico en el modelo *PyMT*.

Los estudios previos que relacionan a las lisil oxidasas con el nicho pre-metastásico postulan exclusivamente su papel en la remodelación de la MEC del pulmón (Erler et al., 2009; Wong et al., 2011). En esta tesis, demostramos que *Loxl2* también afecta positivamente a la expresión de citoquinas y factores de secreción (en el tumor primario y los pulmones) necesarios para el establecimiento del nicho pre-metastásico en el contexto *in vivo* del modelo *PyMT*. Entre ellos, las quimioquinas *S100A8* y *S100A9* son las que se encuentran más afectadas en función de la presencia/ausencia de *Loxl2* en el tumor, lo cual está de acuerdo con nuestras observaciones recientes en modelos singénicos (Canesin et al., 2014). Se sabe que estas dos citoquinas son secretadas por el tumor y por las propias células del parénquima pulmonar ayudando al reclutamiento de células *CD11b⁺/Gr1⁺*, que a su vez inducen la expresión y secreción de más citoquinas *S100* en un proceso de retroalimentación positiva (Hiratsuka et al., 2006; Sinha et al., 2008; Spano and Zollo, 2012). Las proteínas *S100A8* y *S100A9* también promueven la proliferación y migración de las células *CD11b⁺/Gr1⁺* desde la médula ósea (Sinha et al., 2008), lo cual está de acuerdo con las variaciones significativas en los porcentajes de estas células detectados tanto en médula como en sangre en modelos genéticos de *Loxl2*. Además de las proteínas *S100*, otros factores secretados implicados en la expresión de *S100A8/S100A9* y en la expansión de BMDCs, como *GM-CSF*, *VEGF* o *TNF- α* (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Hiratsuka et al., 2006; Serafini et al., 2004) se encuentran alterados por los niveles de *Loxl2* (Figura 37). La MEC juega un papel importante en el establecimiento del nicho pre-metastásico, habiéndose atribuido un papel primordial a las regiones ricas en fibronectina (Kaplan et al., 2005). En este sentido, se ha demostrado que células *CD11b⁺* son reclutadas preferiblemente a zonas ricas en fibronectina y LOX dentro de los órganos secundarios (Erler et al., 2009). Coincidente con estos datos previos, la sobreexpresión de *Loxl2* en el modelo *PyMT* provoca un aumento de la expresión de fibronectina en el pulmón. Además, tanto a nivel de mRNA como de proteína, tenascina-C (TEN-C) se encuentra regulada positivamente en pulmones de los ratones de sobreexpresión de *Loxl2*. Un estudio reciente destacó que TEN-C es secretada por las células tumorales y favorece el crecimiento de las micrometástasis en el nicho metastásico al potenciar las vías de señalización de Notch y Wnt (Oskarsson et al., 2011).

En conjunto, estos resultados apoyan la participación de *Loxl2* en el establecimiento de la metástasis temprana al regular la expresión de citoquinas necesarias para la movilización y el reclutamiento de células *CD11b⁺/Gr1⁺* en los órganos diana, como el pulmón, además de

modular algunos componentes de la MEC (Figura 44). Aunque el mecanismo último por el que Loxl2 desencadena esta cascada es aún desconocido, datos complementarios del grupo indican que Loxl2 regula transcripcionalmente algunos de estos factores, como *GM-CSF* y *TNF α* (Canesin et al., 2014). Además, los ensayos de metástasis experimental con células *PyMT* carentes de Loxl2 muestran que en ausencia del tumor primario Loxl2 también promueve la metástasis, sugiriendo la implicación de mecanismos intrínsecos a las propias células.

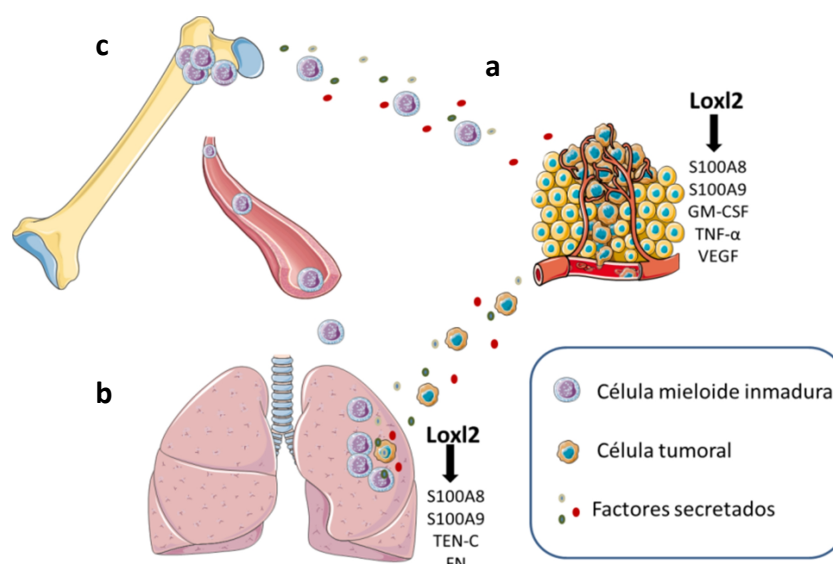


Figura 44. Modelo de la implicación de Loxl2 en la formación del nicho pre-metastásico. La expresión de *Loxl2* en las células del tumor primario (a) regula la transcripción de citoquinas y factores implicados en la formación del nicho (S100A8, S100A9, GM-CSF, TNF- α , VEGF). Estos factores estimulan la producción de citoquinas adicionales en el pulmón (b) que a su vez facilitan el reclutamiento de células mieloides CD11b+/Gr1+ desde la médula ósea, favoreciendo así la formación de micrometástasis. Loxl2 también puede estimular la transcripción de tenascina-C (TEN-C) y fibronectina (FN) en el pulmón, contribuyendo positivamente a la formación de una MEC receptiva para la anidación y colonización metastásica. Además, el aumento, mediado por Loxl2, en la producción de quimioquinas S100 en el tumor primario podría estimular la movilización de células CD11b+/Gr1+ de la médula ósea (c).

A parte de todas estas funciones, se puede especular con la posible actuación de Loxl2 sobre la MEC de la médula ósea, donde podría contribuir a la proliferación y movilización de BMDs (Kaplan et al., 2007) y a la diferenciación de osteoblastos (Hong et al., 2004; Pischon et al., 2009; Turecek et al., 2008). Por otra parte, sería interesante analizar en el futuro la posible secreción de Loxl2 por células del tumor primario en forma de exosomas, dado el relevante papel asignado recientemente a estas partículas en el establecimiento del nicho pre-metastásico y la diferenciación de MDSCs (Castellana et al., 2009; Jung et al., 2009; Peinado et al., 2011; Peinado et al., 2012).

En resumen, los resultados presentados en este trabajo muestran que los modelos *PyMT;L2^{A/-}* y *PyMT;R26^{L2}* representan nuevos sistemas preclínicos *in vivo* para valorar la especificidad y eficiencia de una posible terapia para el cáncer de mama basada en la inhibición de las funciones de LOXL2.

Conclusiones/Conclusions

1. La delección constitutiva de *Loxl2* causa letalidad perinatal debida a defectos cardíacos severos en algunos de los animales afectados.
2. La sobreexpresión constitutiva de *Loxl2* en ratón causa esterilidad en machos, siendo el epidídimo el órgano más afectado a consecuencia de la represión, mediada por *Loxl2*, de cadherina-E y claudina-1, y a la inducción de fibrosis.
3. *Loxl2* regula negativamente y de forma parcial la diferenciación de la epidermis, sin afectar gravemente a la homeostasis de la piel.
4. Durante la carcinogénesis química de piel de ratón inducida por DMBA/TPA, la sobreexpresión constitutiva de *Loxl2* reduce el periodo de latencia, incrementa el número de lesiones generadas e induce su progresión a carcinomas de células escamosas. Por su parte, la delección constitutiva de *Loxl2* disminuye el tamaño de las lesiones y la malignización de las mismas.
5. *Loxl2* incrementa la malignidad tumoral durante la carcinogénesis en piel de ratón, inhibiendo la diferenciación de papilomas a través de la regulación, al menos en parte, de la vía de señalización de Notch1.
6. La delección de *Loxl2* en la glándula mamaria en el modelo murino de cáncer de mama inducido por el oncogén *PyMT* disminuye el número y tamaño de las metástasis pulmonares, mientras que la sobreexpresión de *Loxl2* incrementa la carga metastásica pulmonar.
7. *Loxl2* contribuye positivamente a la generación del nicho pre-metastásico en el modelo de cáncer de mama *PyMT*, favoreciendo la movilización y el reclutamiento al pulmón de células precursoras mieloides CD11b⁺/Gr1⁺.
8. *Loxl2* regula la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular implicados en la formación del nicho pre-metastásico en el contexto de cáncer de mama *PyMT*.
9. La delección o sobreexpresión de *Loxl2* no afecta a la rigidez de la matriz extracelular de los tumores primarios de mama en el modelo *PyMT*.

1. Constitutive *Loxl2* abrogation causes partial perinatal lethality due to severe cardiac defects in some of the affected animals.
2. Constitutive *Loxl2* overexpression causes male sterility by affecting epididymis architectural organization as a consequence of the *Loxl2* mediated repression of E-cadherin and claudin-1 and the induction of stromal fibrosis.
3. *Loxl2* partially downregulates epidermis differentiation without strongly affecting skin homeostasis.
4. In the DMBA/TPA mouse skin carcinogenesis model, constitutive *Loxl2* overexpression reduces latency, increases the number of lesions and favors their progression to squamous cell carcinomas, whereas *Loxl2* deletion decreases the size of lesions and the incidence of progression to squamous cell carcinomas.
5. *Loxl2* increases mouse skin tumor malignancy by inhibiting papilloma differentiation through the regulation, at least in part, of the Notch1 signaling pathway.
6. *Loxl2* deletion in the mammary gland decreases the number and size of pulmonary metastasis whereas *Loxl2* overexpression increases metastatic burden in the context of *PyMT* breast cancer model.
7. *Loxl2* positively contributes to the pre-metastatic niche formation in the *PyMT* breast tumor model by facilitating the mobilization and recruitment to the lung of myeloid precursor CD11b⁺/Gr1⁺ cells.
8. *Loxl2* regulates the expression of cytokines, growth factors and extracellular matrix components involved in the pre-metastatic niche formation in the context of the *PyMT* breast cancer model.
9. *Loxl2* deregulation does not affect the extracellular matrix stiffness of breast primary tumors in the *PyMT* model.

Bibliografía

- Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 4, 1350-1362.
- Akiri, G., Sabo, E., Dafni, H., Vadasz, Z., Kartvelishvily, Y., Gan, N., Kessler, O., Cohen, T., Resnick, M., Neeman, M., and Neufeld, G. (2003). Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res* 63, 1657-1666.
- Alberts B., B. D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (2002). *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. S.A. Barcelona.
- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Farre, R., and Navajas, D. (2003). Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys J* 84, 2071-2079.
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25, 4692-4693.
- Arrighi, S. (2013). Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reprod Fertil Dev*. doi: 10.1071/RD13301. [Epub ahead of print]
- Asuncion, L., Fogelgren, B., Fong, K. S., Fong, S. F., Kim, Y., and Csiszar, K. (2001). A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol* 20, 487-491.
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G., and Mercurio, A. M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 168, 29-33.
- Baker, A. M., Cox, T. R., Bird, D., Lang, G., Murray, G. I., Sun, X. F., Southall, S. M., Wilson, J. R., and Erler, J. T. (2011). The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 103, 407-424.
- Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. T., and Smith, J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307, 658-660.

Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H. R., Gartland, A., and Erler, J. T. (2011). LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res* 71, 1561-1572.

Barker, H. E., Cox, T. R., and Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 540-552.

Barker, H. E., Bird, D., Lang, G., and Erler, J. T. (2013). Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res* 11, 1425-1436.

Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., *et al.* (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med* 16, 1009-1017.

Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.

Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Brechot, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., *et al.* (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* 118, 3979-3989.

Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 207-217.

Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.

Borel, A., Eichenberger, D., Farjanel, J., Kessler, E., Gleyzal, C., Hulmes, D. J., Sommer, P., and Font, B. (2001). Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem* 276, 48944-48949.

Bouez, C., Reynaud, C., Noblesse, E., Thepot, A., Gleyzal, C., Kanitakis, J., Perrier, E., Damour, O., and Sommer, P. (2006). The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin Cancer Res* 12, 1463-1469.

Brekhman, V., Lugassie, J., Zaffryar-Eilot, S., Sabo, E., Kessler, O., Smith, V., Golding, H., and Neufeld, G. (2011). Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *FASEB J* 25, 55-65.

Bunt, S. K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 67, 10019-10026.

Busnadiego, O., Gonzalez-Santamaria, J., Lagares, D., Guinea-Viniegra, J., Pichol-Thievend, C., Muller, L., and Rodriguez-Pascual, F. (2013). LOXL4 is induced by transforming growth factor beta1 through Smad and JunB/Fra2 and contributes to vascular matrix remodeling. *Mol Cell Biol* 33, 2388-2401.

Butcher, D. T., Alliston, T., and Weaver, V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 9, 108-122.

Canesin, G., Cuevas, E. P., Santos, V., Lopez-Menendez, C., Moreno-Bueno, G., Huang, Y., Csiszar, K., Portillo, F., Peinado, H., Lyden, D., and Cano, A. (2014). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene advance online publication*, 17 March 2014; doi:10.1038/onc.2014.23.

Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

Cano, A., Santamaria, P. G., and Moreno-Bueno, G. (2012). LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol* 8, 1095-1108.

Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C. J., and Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 71, 245-254.

Castellana, D., Zobairi, F., Martinez, M. C., Panaro, M. A., Mitolo, V., Freyssinet, J. M., and Kunzelmann, C. (2009). Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 69, 785-793.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278.

Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D., and Friedman, R. M. (1990). Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science* 249, 796-798.

Cox, T. R., Bird, D., Baker, A. M., Barker, H. E., Ho, M. W., Lang, G., and Erler, J. T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res* 73, 1721-1732.

Cronshaw, A. D., Fothergill-Gilmore, L. A., and Hulmes, D. J. (1995). The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem J* 306, 279-284.

Csiszar, K. (2001). Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70, 1-32.

Csiszar, K., Fong, S. F., Ujfalusi, A., Krawetz, S. A., Salvati, E. P., Mackenzie, J. W., and Boyd, C. D. (2002). Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer* 97, 636-642.

Cuevas, E. P., Moreno-Bueno, G., Canesin, G., Santos, V., Portillo, F., and Cano, A. (2014). LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol Open* 3, 129-137.

Cyr, D. G., Gregory, M., Dube, E., Dufresne, J., Chan, P. T., and Hermo, L. (2007). Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 9, 463-475.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., and Drevet, J. R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J Anim Sci* 88, 1321-1331.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Dacheux, J. L., Dacheux, F., and Paquignon, M. (1989). Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod* 40, 635-651.

De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13, 97-110.

Dominguez, D., Montserrat-Sentis, B., Virgos-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Franci, C., and Garcia de Herreros, A. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 23, 5078-5089.

Dube, E., Chan, P. T., Hermo, L., and Cyr, D. G. (2007). Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biol Reprod* 76, 1034-1044.

Dube, E., Hermo, L., Chan, P. T., and Cyr, D. G. (2010). Alterations in the human blood-epididymis barrier in obstructive azoospermia and the development of novel epididymal cell lines from infertile men. *Biol Reprod* 83, 584-596.

Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H., and Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24, 2375-2385.

Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S., and Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222-1226.

Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q. T., and Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35-44.

Estrada E., U. M. C. (2002). Atlas de histología de vertebrados, (Universidad Nacional Autónoma de México).

Fong, S. F., Dietzsch, E., Fong, K. S., Hollosi, P., Asuncion, L., He, Q., Parker, M. I., and Csiszar, K. (2007). Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 644-655.

Frew, I. J., Minola, A., Georgiev, S., Hitz, M., Moch, H., Richard, S., Vortmeyer, A. O., and Krek, W. (2008). Combined VHLH and PTEN mutation causes genital tract cystadenoma and squamous metaplasia. *Mol Cell Biol* 28, 4536-4548.

Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.

Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111, 2807-2814.

Fujii, T., Fuchs, B. C., Yamada, S., Lauwers, G. Y., Kulu, Y., Goodwin, J. M., Lanuti, M., and Tanabe, K. K. (2010). Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol* 10, 79.

Fujimoto, E., and Tajima, S. (2009). Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 55, 91-98.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D. P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150-4166.

Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.

Gambichler, T., and Skrygan, M. (2013). Decreased lysyl oxidase-like 2 expression in mid-dermal elastolysis. *Arch Dermatol Res* 305, 359-363.

Gao, D., Joshi, N., Choi, H., Ryu, S., Hahn, M., Catena, R., Sadik, H., Argani, P., Wagner, P., Vahdat, L. T., *et al.* (2012). Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Res* 72, 1384-1394.

Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95, 605-614.

Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R., and Di Donato, A. (2000). Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *J Biol Chem* 275, 36341-36349.

Giampuzzi, M., Botti, G., Cilli, M., Gusmano, R., Borel, A., Sommer, P., and Di Donato, A. (2001). Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J Biol Chem* 276, 29226-29232.

Giampuzzi, M., Oleggini, R., and Di Donato, A. (2003). Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 1647, 245-251.

Gilad, G. M., Kagan, H. M., and Gilad, V. H. (2005). Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 376, 210-214.

Gitlin, J. D. (2003). Wilson disease. *Gastroenterology* 125, 1868-1877.

Gorogh, T., Weise, J. B., Holtmeier, C., Rudolph, P., Hedderich, J., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Ambrosch, P., and Csiszar, K. (2007). Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 212, 74-82.

Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., and Cyr, D. (2001). Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142, 854-863.

Grimsby, J. L., Lucero, H. A., Trackman, P. C., Ravid, K., and Kagan, H. M. (2010). Role of lysyl oxidase propeptide in secretion and enzyme activity. *J Cell Biochem* 111, 1231-1243.

Grooteclaes, M. L., and Frisch, S. M. (2000). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* 19, 3823-3828.

Guinea-Viniegra, J., Zenz, R., Scheuch, H., Jimenez, M., Bakiri, L., Petzelbauer, P., and Wagner, E. F. (2012). Differentiation-induced skin cancer suppression by FOS, p53, and TACE/ADAM17. *J Clin Invest* 122, 2898-2910.

Gupta, G. P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

Guy, C. T., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12, 954-961.

Hajra, K. M., Chen, D. Y., and Fearon, E. R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613-1618.

Hartwell, K. A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A. E., Sgroi, D. C., and Weinberg, R. A. (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18969-18974.

Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., Boyd, C. D., Csiszar, K., and Hayashi, M. (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* 35, 845-855.

Helmer, R. A., Martinez-Zaguilan, R., Dertien, J. S., Fulford, C., Foreman, O., Peiris, V., and Chilton, B. S. (2013). Helicase-like transcription factor (hltf) regulates g2/m transition, wt1/gata4/hif-1a cardiac transcription networks, and collagen biogenesis. *PLoS One* 8, e80461.

Hermo, L., Oko, R., and Morales, C. R. (1994). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol* 154, 106-189.

Herranz, N., Dave, N., Millanes-Romero, A., Morey, L., Diaz, V. M., Lorenz-Fonfria, V., Gutierrez-Gallego, R., Jeronimo, C., Di Croce, L., Garcia de Herreros, A., and Peiro, S. (2012). Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Mol Cell* 46, 369-376.

Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., *et al.* (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8, R76.

Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., *et al.* (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 3810-3820.

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., and Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* 8, 1369-1375.

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., and Maru, Y. (2008). The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 10, 1349-1355.

Holtmeier, C., Gorogh, T., Beier, U., Meyer, J., Hoffmann, M., Gottschlich, S., Heidorn, K., Ambrosch, P., and Maune, S. (2003). Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 23, 2585-2591.

Hollosi, P., Yakushiji, J. K., Fong, K. S., Csiszar, K., and Fong, S. F. (2009). Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer* 125, 318-327.

Hong, H. H., Pischon, N., Santana, R. B., Palamakumbura, A. H., Chase, H. B., Gantz, D., Guo, Y., Uzel, M. I., Ma, D., and Trackman, P. C. (2004). A role for lysyl oxidase regulation in the control of normal collagen deposition in differentiating osteoblast cultures. *J Cell Physiol* 200, 53-62.

Horak, C. E., and Steeg, P. S. (2005). Metastasis gets site specific. *Cancer Cell* 8, 93-95.

Hornstra, I. K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A. J., Mecham, R. P., and Shapiro, S. D. (2003). Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 278, 14387-14393.

Huang, H., Song, T. J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M. D., and Tang, Q. Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12670-12675.

Izbicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., and Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83, 111-119.

Jansen, M. K., and Csiszar, K. (2007). Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells. *Matrix Biol* 26, 136-139.

Jourdan-Le Saux, C., Le Saux, O., Gleyzal, C., Sommer, P., and Csiszar, K. (2000). The mouse lysyl oxidase-like 2 gene (mLOXL2) maps to chromosome 14 and is highly expressed in skin, lung and thymus. *Matrix Biol* 19, 179-183.

Jung, T., Castellana, D., Klingbeil, P., Cuesta Hernandez, I., Vitacolonna, M., Orlicky, D. J., Roffler, S. R., Brodt, P., and Zoller, M. (2009). CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 11, 1093-1105.

Kagan, H. M., Williams, M. A., Calaman, S. D., and Berkowitz, E. M. (1983). Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun* 115, 186-192.

Kagan, H. M. (1994). Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol Res Pract* 190, 910-919.

Kagan, H. M., and Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88, 660-672.

Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2004). Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* 64, 6410-6415.

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., *et al.* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820-827.

Kaplan, R. N., Psaila, B., and Lyden, D. (2006). Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 25, 521-529.

Kaplan, R. N., Psaila, B., and Lyden, D. (2007). Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med* 13, 72-81.

Karen, J., Wang, Y., Javaherian, A., Vaccariello, M., Fusenig, N. E., and Garlick, J. A. (1999). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces clonal expansion of potentially malignant keratinocytes in a tissue model of early neoplastic progression. *Cancer Res* 59, 474-481.

Kemp, C. J. (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 15, 460-473.

Kenyon, K., Contente, S., Trackman, P. C., Tang, J., Kagan, H. M., and Friedman, R. M. (1991). Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science* 253, 802.

Khakoo, A., Thomas, R., Trompeter, R., Duffy, P., Price, R., and Pope, F. M. (1997). Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin Genet* 51, 109-114.

Kim, Y., Boyd, C. D., and Csiszar, K. (1995). A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem* 270, 7176-7182.

Kim, Y., Roh, S., Park, J. Y., Kim, Y., Cho, D. H., and Kim, J. C. (2009). Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas. *Oncol Rep* 22, 799-804.

Kim, Y. M., Kim, E. C., and Kim, Y. (2011). The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol Biol Rep* 38, 145-149.

Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., and Hendrix, M. J. (2002). A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 62, 4478-4483.

Kowanetz, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., *et al.* (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 21248-21255.

Kuivaniemi, H., Peltonen, L., and Kivirikko, K. I. (1985). Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am J Hum Genet* *37*, 798-808.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 178-196.

Lapointe, J., Li, C., Higgins, J. P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., *et al.* (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 811-816.

Lapouge, G., Youssef, K. K., Vokaer, B., Achouri, Y., Michaux, C., Sotiropoulou, P. A., and Blanpain, C. (2011). Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 7431-7436.

Le Provost, G. S., Debret, R., Cenizo, V., Aimond, G., Pez, F., Kaniewski, B., Andre, V., and Sommer, P. (2010). Lysyl oxidase silencing impairs keratinocyte differentiation in a reconstructed-epidermis model. *Exp Dermatol* *19*, 1080-1087.

Lefort, K., and Dotto, G. P. (2004). Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin Cancer Biol* *14*, 374-386.

Lefort, K., Mandinova, A., Ostano, P., Kolev, V., Calpini, V., Kolfshoten, I., Devgan, V., Lieb, J., Raffoul, W., Hohl, D., *et al.* (2007). Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev* *21*, 562-577.

Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891-906.

Li, P. A., He, Q., Cao, T., Yong, G., Szauter, K. M., Fong, K. S., Karlsson, J., Keep, M. F., and Csiszar, K. (2004). Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 120, 115-122.

Li, T. Y., Xu, L. Y., Wu, Z. Y., Liao, L. D., Shen, J. H., Xu, X. E., Du, Z. P., Zhao, Q., and Li, E. M. (2012). Reduced nuclear and ectopic cytoplasmic expression of lysyl oxidase-like 2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 43, 1068-1076.

Li, W., Nellaippan, K., Strassmaier, T., Graham, L., Thomas, K. M., and Kagan, H. M. (1997). Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12817-12822.

Li, W., Liu, G., Chou, I. N., and Kagan, H. M. (2000). Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 78, 550-557.

Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., and Pollard, J. W. (2003). Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163, 2113-2126.

Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J., and Li, T. (2004). Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 36, 178-182.

Lockhart, M., Wirrig, E., Phelps, A., and Wessels, A. (2011). Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91, 535-550.

Lopez, J. I., Kang, I., You, W. K., McDonald, D. M., and Weaver, V. M. (2011). In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol (Camb)* 3, 910-921.

Lozano, J. R., Kiracofe, D., Melcher, J., Garcia, R., and Raman, A. (2010). Calibration of higher eigenmode spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Nanotechnology* 21, 465502.

Lucero, H. A., and Kagan, H. M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 63, 2304-2316.

Lugassy, J., Zaffryar-Eilot, S., Soueid, S., Mordoviz, A., Smith, V., Kessler, O., and Neufeld, G. (2012). The enzymatic activity of lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is not required for LOXL2-induced inhibition of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 287, 3541-3549.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., *et al.* (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-1201.

MacPherson, M. R., Molina, P., Souchelnytskyi, S., Wernstedt, C., Martin-Perez, J., Portillo, F., and Cano, A. (2010). Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell* 21, 244-253.

Maki, J. M., and Kivirikko, K. I. (2001). Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J* 355, 381-387.

Maki, J. M., Tikkanen, H., and Kivirikko, K. I. (2001). Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. *Matrix Biol* 20, 493-496.

Maki, J. M., Rasanen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Makikallio, K., Kivirikko, K. I., and Soininen, R. (2002). Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 106, 2503-2509.

Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R., and Myllyharju, J. (2005). Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol* 167, 927-936.

Maki, J. M. (2009). Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol* 24, 651-660.

Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., and Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 452, 650-653.

Mani, S. A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J. L., Hartwell, K., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2007). Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10069-10074.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Margadant, C., and Sonnenberg, A. (2010). Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep* 11, 97-105.

Meeran, S. M., Vaid, M., Punathil, T., and Katiyar, S. K. (2009). Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-caused skin tumor promotion in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mouse skin, which is associated with the inhibition of inflammatory responses. *Carcinogenesis* 30, 520-528.

Millanes-Romero, A., Herranz, N., Perrera, V., Iturbide, A., Loubat-Casanovas, J., Gil, J., Jenuwein, T., Garcia de Herreros, A., and Peiro, S. (2013). Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell* 52, 746-757.

Min, C., Kirsch, K. H., Zhao, Y., Jeay, S., Palamakumbura, A. H., Trackman, P. C., and Sonenshein, G. E. (2007). The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res* 67, 1105-1112.

Moon, H. J., Finney, J., Xu, L., Moore, D., Welch, D. R., and Mure, M. (2013). MCF-7 cells expressing nuclear associated lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) exhibit an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenotype and are highly invasive in vitro. *J Biol Chem* 288, 30000-30008.

Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3, e2888.

Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F., and Cano, A. (2009). The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc* 4, 1591-1613.

Moreno-Bueno, G., Salvador, F., Martin, A., Floristan, A., Cuevas, E. P., Santos, V., Montes, A., Morales, S., Castilla, M. A., Rojo-Sebastian, A., *et al.* (2011). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol Med* 3, 528-544.

Morris, R. J., Coulter, K., Tryson, K., and Steinberg, S. R. (1997). Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res* 57, 3436-3443.

Morris, R. J. (2000). Keratinocyte stem cells: targets for cutaneous carcinogens. *J Clin Invest* 106, 3-8.

Mouw, J. K., Yui, Y., Damiano, L., Bainer, R. O., Lakins, J. N., Acerbi, I., Ou, G., Wijekoon, A. C., Levental, K. R., Gilbert, P. M., *et al.* (2014). Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nat Med* 20, 360-367.

Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., *et al.* (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235-1239.

Naito, M., and DiGiovanni, J. (1989). Genetic background and development of skin tumors. *Carcinog Compr Surv* 11, 187-212.

Nellaippan, K., Risitano, A., Liu, G., Nicklas, G., and Kagan, H. M. (2000). Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem* 79, 576-582.

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33, 416-421.

Nieto, M. A., and Cano, A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 22, 361-368.

Nieto, M. A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342, 1234850.

Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., *et al.* (2012). Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One* 7, e38565.

Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M. P., Sommer, P., and Damour, O. (2004). Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol* 122, 621-630.

Nowell, C., and Radtke, F. (2013). Cutaneous Notch signaling in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a017772.

Nyabi, O., Naessens, M., Haigh, K., Gembarska, A., Goossens, S., Maetens, M., De Clercq, S., Drogat, B., Haenebalcke, L., Bartunkova, S., *et al.* (2009). Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic Acids Res* 37, e55.

Offenberg, H., Brunner, N., Mansilla, F., Orntoft Torben, F., and Birkenkamp-Demtroder, K. (2008). TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles. *Mol Oncol* 2, 233-240.

Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. (2000). Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 60, 5007-5011.

Onuigbo, W. I. B. (1962). Patterns of Metastasis in Lung Cancer: A Review. *Cancer Res* 21, 1077-1087.

Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., Downey, R. J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massague, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17, 867-874.

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98-101.

Palamakumbura, A. H., Jeay, S., Guo, Y., Pischon, N., Sommer, P., Sonenshein, G. E., and Trackman, P. C. (2004). The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem* 279, 40593-40600.

Pan, P. Y., Wang, G. X., Yin, B., Ozao, J., Ku, T., Divino, C. M., and Chen, S. H. (2008). Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111, 219-228.

Panchenko, M. V., Stetler-Stevenson, W. G., Trubetskoy, O. V., Gacheru, S. N., and Kagan, H. M. (1996). Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem* 271, 7113-7119.

Panelos, J., and Massi, D. (2009). Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer. *Cancer Biol Ther* 8, 1986-1993.

Payne, S. L., Fogelgren, B., Hess, A. R., Seftor, E. A., Wiley, E. L., Fong, S. F., Csiszar, K., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2005). Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 65, 11429-11436.

Payne, S. L., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2006). Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex. *J Cell Biochem* 98, 827-837.

Payne, S. L., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2007). Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 101, 1338-1354.

Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.

Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K. S., Vega, S., Nieto, M. A., Cano, A., and Portillo, F. (2005a). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J* 24, 3446-3458.

Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2005b). Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle* 4, 1749-1752.

Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-428.

Peinado, H., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Perez-Gomez, E., Santos, V., Mendiola, M., de Diego, J. I., Nistal, M., Quintanilla, M., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 68, 4541-4550.

Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 21, 139-146.

Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18, 883-891.

Peng, L., Ran, Y. L., Hu, H., Yu, L., Liu, Q., Zhou, Z., Sun, Y. M., Sun, L. C., Pan, J., Sun, L. X., *et al.* (2009). Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis* 30, 1660-1669.

Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.

Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276, 27424-27431.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Pinnell, S. R., and Martin, G. R. (1968). The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-aminoadipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 708-716.

Pischon, N., Maki, J. M., Weisshaupt, P., Heng, N., Palamakumbura, A. H., N'Guessan, P., Ding, A., Radlanski, R., Renz, H., Bronckers, T. A., *et al.* (2009). Lysyl oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int* 85, 119-126.

Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.

Poulsen, L., Horn, N., Heilstrup, H., Lund, C., Tumer, Z., and Moller, L. B. (2002). X-linked recessive Menkes disease: identification of partial gene deletions in affected males. *Clin Genet* 62, 449-457.

Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 9, 285-293.

Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., and Balmain, A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78-80.

Rafii, S., and Lyden, D. (2006). S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. *Nat Cell Biol* 8, 1321-1323.

Remus, E. W., O'Donnell, R. E., Jr., Rafferty, K., Weiss, D., Joseph, G., Csiszar, K., Fong, S. F., and Taylor, W. R. (2012). The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H1067-1075.

Rich L., W. P. (2005). Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J morphol Sci* 22, 97-104.

Ritch, R. (2008). Exfoliation syndrome: beyond glaucoma. *Arch Ophthalmol* 126, 859-861.

Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Raposo, B., Alcudia, J. F., Guadall, A., and Badimon, L. (2008). Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 79, 7-13.

Rodriguez, H. M., Vaysberg, M., Mikels, A., McCauley, S., Velayo, A. C., Garcia, C., and Smith, V. (2010). Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *J Biol Chem* 285, 20964-20974.

Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I. O., Gorogh, T., Dunne, A. A., and Werner, J. A. (2003). Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 23, 1565-1573.

Royce, P. M., Camakaris, J., and Danks, D. M. (1980). Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem J* 192, 579-586.

Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., and Goldstein, S. (1997). Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J Biol Chem* 272, 8157-8160.

Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schroder, E., Zhou, J., Brunton, V. G., *et al.* (2011). Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and beta-catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* 19, 776-791.

Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68, 989-997.

Sarrió, J. D. (2007) Alteraciones moleculares del complejo de adhesión cadherinas-cateninas y su implicación en el cáncer de mama, Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.

Sceneay, J., Chow, M. T., Chen, A., Halse, H. M., Wong, C. S., Andrews, D. M., Sloan, E. K., Parker, B. S., Bowtell, D. D., Smyth, M. J., and Moller, A. (2012). Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res* 72, 3906-3911.

Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schodel, J., Mole, D. R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Struebe, M., Behrens, J., Eckardt, K. U., and Wiesener, M. S. (2010). The lysyl oxidases

LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem* 285, 6658-6669.

Schmidt, H., Semjonow, A., Csiszar, K., Korsching, E., Brandt, B., and Eltze, E. (2007). Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91, 302-307.

Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080-5081.

Seiler, P., Wenzel, I., Wagenfeld, A., Yeung, C. H., Nieschlag, E., and Cooper, T. G. (1998). The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *Int J Androl* 21, 217-226.

Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., and Borrello, I. (2004). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 64, 6337-6343.

Shook, D., and Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120, 1351-1383.

Sibon, I., Sommer, P., Lamaziere, J. M., and Bonnet, J. (2005). Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart* 91, e33.

Siegel, R. C. (1974). Biosynthesis of collagen crosslinks: increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4826-4830.

Siegel, R. C., Chen, K. H., Greenspan, J. S., and Aguiar, J. M. (1978). Biochemical and immunochemical study of lysyl oxidase in experimental hepatic fibrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2945-2949.

Silver, F. H., Siperko, L. M., and Seehra, G. P. (2003). Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol* 9, 3-23.

Sims, K. B. (2001). Von Hippel-Lindau disease: gene to bedside. *Curr Opin Neurol* 14, 695-703.

Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67, 4507-4513.

Sinha, P., Okoro, C., Foell, D., Freeze, H. H., Ostrand-Rosenberg, S., and Srikrishna, G. (2008). Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 181, 4666-4675.

Smith-Mungo, L. I., and Kagan, H. M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16, 387-398.

Sobrado, V. R., Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Holt, L. J., Nieto, M. A., Portillo, F., and Cano, A. (2009). The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci* 122, 1014-1024.

Spano, D., and Zollo, M. (2012). Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis* 29, 381-395.

Stassar, M. J., Devitt, G., Brosius, M., Rinnab, L., Prang, J., Schradin, T., Simon, J., Petersen, S., Kopp-Schneider, A., and Zoller, M. (2001). Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 85, 1372-1382.

Sullivan, R. (2004). Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci* 82-83, 341-347.

Takahashi, M., Rhodes, D. R., Furge, K. A., Kanayama, H., Kagawa, S., Haab, B. B., and Teh, B. T. (2001). Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9754-9759.

Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-1455.

Takeshima, H., Yagi, A., Yano, M., Sakamoto, N., Kato, S., Kuriki, J., Arao, M., Takikawa, T., and Hayashi, H. (1993). Hepatic copper accumulation in patients with primary biliary cirrhosis. *Nagoya J Med Sci* 55, 115-123.

Tarkkanen, A. (2008). Is exfoliation syndrome a sign of systemic vascular disease? *Acta Ophthalmol* 86, 832-836.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Thiery, J. P., and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Thorleifsson, G., Magnusson, K. P., Sulem, P., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Stefansson, H., Jonsson, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Stefansdottir, G., *et al.* (2007). Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 317, 1397-1400.

Trackman, P. C., Bedell-Hogan, D., Tang, J., and Kagan, H. M. (1992). Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* 267, 8666-8671.

Turecek, C., Fratzl-Zelman, N., Rumpler, M., Buchinger, B., Spitzer, S., Zoehrer, R., Durchschlag, E., Klaushofer, K., Paschalis, E. P., and Varga, F. (2008). Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation. *Calcif Tissue Int* 82, 392-400.

Uzel, M. I., Scott, I. C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A. H., Pappano, W. N., Hong, H. H., Greenspan, D. S., and Trackman, P. C. (2001). Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 276, 22537-22543.

Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H. M., Baruch, Y., Izhak, O. B., and Neufeld, G. (2005). Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol* 43, 499-507.

Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275-292.

Van Vliet, P., Wu, S. M., Zaffran, S., and Puceat, M. (2012). Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc Res* 96, 352-362.

Veri, J. P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl* 14, 23-44.

Voloshenyuk, T. G., Hart, A. D., Khoutorova, E., and Gardner, J. D. (2011). TNF-alpha increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF-beta and PI3Kinase signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 370-375.

von Gise, A., and Pu, W. T. (2012). Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res* 110, 1628-1645.

Wagner, K. U., McAllister, K., Ward, T., Davis, B., Wiseman, R., and Hennighausen, L. (2001). Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res* 10, 545-553.

Wang, X., Zheng, M., Liu, G., Xia, W., McKeown-Longo, P. J., Hung, M. C., and Zhao, J. (2007). Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res* 67, 7184-7193.

Warburton, D., and Shi, W. (2005). Lo, and the niche is knit: lysyl oxidase activity and maintenance of lung, aorta, and skin integrity. *Am J Pathol* 167, 921-922.

Watt, F. M., Estrach, S., and Ambler, C. A. (2008). Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 20, 171-179.

Wiel, C., Augert, A., Vincent, D. F., Gitenay, D., Vindrieux, D., Le Calve, B., Arfi, V., Lallet-Daher, H., Reynaud, C., Treilleux, I., *et al.* (2013). Lysyl oxidase activity regulates oncogenic stress response and tumorigenesis. *Cell Death Dis* 4, e855.

Wong, C. C., Gilkes, D. M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S. I., Wong, C. M., Khoo, U. S., Ng, I. O., *et al.* (2011). Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16369-16374.

Wu, G., Guo, Z., Chang, X., Kim, M. S., Nagpal, J. K., Liu, J., Maki, J. M., Kivirikko, K. I., Ethier, S. P., Trink, B., and Sidransky, D. (2007). LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res* 67, 4123-4129.

Xie, J. (2008). Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 624, 241-251.

Xu, L., Go, E. P., Finney, J., Moon, H., Lantz, M., Rebecchi, K., Desaire, H., and Mure, M. (2013). Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2 (rhLOXL2) secreted from *Drosophila* S2 cells. *J Biol Chem* 288, 5357-5363.

Yan, H. H., Pickup, M., Pang, Y., Gorska, A. E., Li, Z., Chytil, A., Geng, Y., Gray, J. W., Moses, H. L., and Yang, L. (2010). Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Res* 70, 6139-6149.

Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.

Ye, X. Z., Yu, S. C., and Bian, X. W. (2010). Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J Genet Genomics* 37, 423-430.

Yeung, C. H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., and Cooper, T. G. (1994). Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod* 50, 917-926.

Yook, J. I., Li, X. Y., Ota, I., Fearon, E. R., and Weiss, S. J. (2005). Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* 280, 11740-11748.

Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M., and Kiyono, T. (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27, 3732-3742.

Yuspa, S. H., Dlugosz, A. A., Denning, M. F., and Glick, A. B. (1996). Multistage carcinogenesis in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 147-150.

Zaffryar-Eilot, S., Marshall, D., Voloshin, T., Bar-Zion, A., Spangler, R., Kessler, O., Ghermazien, H., Brekhman, V., Suss-Toby, E., Adam, D., *et al.* (2013). Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours. *Carcinogenesis* 34, 2370-2379.

Zeisberg, M., Soubasakos, M. A., and Kalluri, R. (2005). Animal models of renal fibrosis. *Methods Mol Med* 117, 261-272.

Zhan, P., Shen, X. K., Qian, Q., Zhu, J. P., Zhang, Y., Xie, H. Y., Xu, C. H., Hao, K. K., Hu, W., Xia, N., *et al.* (2012). Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas. *Med Oncol* 29, 648-655.

Zhang, K., Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R. J., Mingot, J. M., Nojima, H., Nieto, M. A., and Longmore, G. D. (2012). Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J* 31, 29-43.

Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., and Hung, M. C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.

Zuber, J., Tchernitsa, O. I., Hinzmann, B., Schmitz, A. C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., and Schafer, R. (2000). A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24, 144-152.

Anexo



Durante el desarrollo de la tesis el parte del trabajo llevado a cabo por el doctorando ha dado lugar a la siguiente publicación:

Autores: Gema Moreno-Bueno, Fernando Salvador, Alberto Martín, Alfredo Floristán, Eva P. Cuevas, Vanesa Santos, Amalia Montes, Saleta Morales, Maria Angeles Castilla, Alejandro Rojo-Sebastián, Alejandra Martínez, David Hardisson, Katalin Csiszar, Francisco Portillo, Héctor Peinado, José Palacios and Amparo Cano.

Título: Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas

Referencia: EMBO Molecular Medicine 3(9):528-44 (2011).

